

SÉRIE A, N° 153

N° D'ORDRE : 175

THÈSES

PRÉSENTÉES

à la Faculté des Sciences de Paris

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

Raymond LECOURT

Licencié ès-sciences

1^{re} THÈSE. — Recherches sur la toxicité de la farine de froment pour la levure.

2^{me} THÈSE. — Rayons X et structure cristalline.

Soutenues le 7^e Juin 1927 devant la commission d'examen

Président : M. P. PORTIER

Examineurs : $\left\{ \begin{array}{l} \text{M. H. MOUTON} \\ \text{M. A. FERNBACH} \end{array} \right.$

IMPRIMERIE DES HUMANITÉS CONTEMPORAINES

27, rue du Sommerard - Paris (V^e)

1927

SÉRIE A, N° 153

N° D'ORDRE : 175

THÈSES

PRÉSENTÉES

à la Faculté des Sciences de Paris

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

Raymond LECOURT

Licencié ès-sciences

1^{re} THÈSE. — Recherches sur la toxicité de la farine de froment pour la levure.

2^{me} THÈSE. — Rayons X et structure cristalline.

Soutenues le Juin 1927 devant la commission d'examen

Président : M. P. PORTIER

Examineurs : $\left\{ \begin{array}{l} \text{M. H. MOUTON} \\ \text{M. A. FERNBACH} \end{array} \right.$

IMPRIMERIE DES HUMANITÉS CONTEMPORAINES

27, rue du Sommerard - Paris (V)

1927

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du globe.

Doyens honoraires. . . P. APPELL, M. MOLLIARD.

Professeurs honoraires.

P. PUISEUX.
V. BOUSSINESQ.
A. JOANNIS.
H. LE CHATELIER.
H. LEBESGUE.
A. FERNBACH.
A. LEDUC.
G. SAGNAC.



Professeurs

Émile PICARD . . . Analyse supérieure et algèbre supérieure.
G. KOENIGS . . . Mécanique physique et expérimentale.
E. GOURSAT . . . Calcul différentiel et calcul intégral.
P. JANET . . . Electrotechnique générale.
F. WALLERANT . . . Minéralogie.
H. ANDOYER . . . Astronomie.
P. PAINLEVÉ . . . Mécanique analytique et mécanique céleste.
E. HAUG . . . Géologie.
Gabriel BERTRAND . . . Chimie biologique.
M^{me} P. CURIE . . . Physique générale et radioactivité.
M. CAULLERY . . . Zoologie (Évolution des êtres organisés).
C. CHABRIÉ . . . Chimie appliquée.
G. URBAIN . . . Chimie minérale.
Émile BOREL . . . Calcul des probabilités et Physique mathém. .
L. MARCHIS . . . Aviation.
Jean Perrin . . . Chimie physique.
Rémy PERRIER . . . Zoologie (Enseignement P. C. N.).
H. ABRAHAM . . . Physique.
M. MOLLIARD . . . Physiologie végétale.
E. CARTAN . . . Géométrie supérieure.
L. LAPICQUE . . . Physiologie générale.
E. VESSIOT . . . Théorie des groupes et calcul des variations.
A. COTTON . . . Physique générale.
J. DRACH . . . Application de l'analyse à la géométrie.
Charles FABRY . . . Physique.
Charles PÉREZ . . . Zoologie.
Léon BERTRAND . . . Géologie appliquée et géologie régionale.
R. LESPIEAU . . . Théories chimiques.
E. RABAUD . . . Biologie expérimentale.
P. PORTIER . . . Physiologie comparée.
E. BLAISE . . . Chimie organique.
P.-A. DANGEARD . . . Botanique.
P. MONTEL . . . Mécanique rationnelle.
P. WINTREBERT . . . Anatomie et histologie comparées.
O. DUBOSCQ . . . Biologie maritime.
G. JULIA . . . Mathématiques générales.
A. JOB . . . Chimie générale.
A. MAILHE . . . Étude des combustibles.
L. LUTAUD . . . Géographie physique.
Eugène BLOCH . . . Physique théorique et physique céleste.

E. HÉROUARD . . . Zoologie.
E. PÉCHARD . . . Chimie (Enseig^t P. C. N.).
V. AUGER . . . Chimie analytique.
M. GUICHARD . . . Chimie minérale.
A. GUILLET . . . Physique.
C. MAUGUIN . . . Minéralogie.
L. BLAIRINGHEM . . . Botanique.
A. MICHEL-LÉVY . . . Géographie.
A. DEREIMS . . . Géologie.
R. DONGIER . . . Physique du globe.
A. DENJOY . . . Calcul différent. et intégr.
H. BÉNARD . . . Physique (P. C. N.).

E. DARMOIS . . . Physique.
G. BRUHAT . . . Physique.
H. MOUTON . . . Chimie physique.
L. JOLEAUD . . . Paléontologie.
M. JAVILLIER . . . Chimie biologique.
A. DEFOUR . . . Physique (P. N. C.).
F. PICARD . . . Zoologie (Évolution des
êtres organisés).
ROBERT-LÉVY . . . Zoologie.
L. DUNOYER . . . Optique appliquée.
A. GUILLIERMOND . . . Botanique (P. C. N.).
A. DEBIERNE . . . Radioactivité.

Secrétaire. Daniel TOMBECK.

A M. LE DOCTEUR E. ROUX

Membre de l'Institut
Directeur de l'Institut Pasteur

A M. A. FERNBACH

Professeur à l'Institut Pasteur
Professeur honoraire à la Faculté des Sciences

Hommages respectueux.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INTRODUCTION

William Jago, en 1895, signala le premier que l'addition de farine de froment arrête la fermentation par la levure de brasserie tandis que cette addition est sans influence sur la levure de distillerie.

Sans fournir d'explication de ce fait, il émit l'opinion que la substance nocive pour la levure de brasserie était de nature protéique.

Malheureusement l'observation de Jago se perdit.

Douze ans plus tard, à l'Institut de Brasserie de Berlin le Professeur Lange, étudiant l'état physiologique de la levure, constatait que la présence de nombreuses substances, et en particulier de combinaisons azotées et phosphorées, avait une influence heureuse sur l'activité de la levure. Les combinaisons azotées et phosphorées donnent pour une grande part leur valeur aux matières premières employées dans les industries de fermentation. Lange crut bon d'essayer l'effet de ces matières premières : orge, seigle, avoine, froment, maïs, ainsi que les malts qui en proviennent. S'étant d'abord servi d'une levure de distillerie, il obtint des résultats conformes à ses vues : les céréales et leurs malts excitaient extraordinairement l'activité de la levure dans une solution de sucre à 10 %. Elles la multipliaient par 2 ou 3 en deux heures. Il voulut ensuite faire les mêmes essais avec une levure de bière basse et c'est alors qu'il fit une constatation extrêmement curieuse : tandis que la mouture de maïs et d'avoine était fortement excitante, l'orge, le seigle et le froment avaient un effet gênant si considérable que la levure perdait presque complètement toute activité.

Lange commença l'étude de la nature de la substance gênante contenue dans les céréales et de son mode d'action.

Cette étude fut ensuite poursuivie à l'Institut de Brasserie de Berlin par les Professeurs Henneberg et Hayduck et par leurs élèves.

En plus de l'intérêt que ce travail présentait par lui-même les auteurs lui donnaient une double portée scientifique et pratique. Le point de vue pratique était celui des industries qui emploient la levure et particulièrement la brasserie. La substance nocive subsistait-elle dans le malt après le touraillage et pouvait-on la retrouver dans le moût? Si oui, elle était susceptible d'expliquer les difficultés de fermentation de certains moûts et les dégénérescences de la levure que l'on observe quelquefois. D'autre part, on sait depuis longtemps que dans chaque famille végétale, il y a des sortes qui sont particulièrement résistantes à l'envahissement par les moisissures et certains botanistes ont supposé que les plantes sont parfois pourvues par la nature d'antiseptiques protecteurs comme les acides organiques, les alcaloïdes, les glucosides et aussi des toxines et des diastases. Les auteurs pensaient que l'étude de l'action toxique des céréales sur la levure était de nature à fournir une nouvelle contribution à cette importante question.

En Angleterre, un peu plus tard, Baker et Hulton se préoccupèrent surtout du rôle de la substance toxique dans la fermentation panaière. Dans cette fermentation, en effet, l'emploi de la levure de distillerie, ou des levures spéciales de boulangerie, est toujours préférable à celui de la levure de brasserie qui se montre bien moins active.

Vers la même époque, enfin, Lindet, Professeur à l'Institut agronomique, s'occupa incidemment de la question au cours d'une étude sur le rôle de la levure en boulangerie.

Il est nécessaire, avant d'exposer mon propre travail, de passer en revue les recherches de ces différents auteurs et de classer les résultats acquis. Deux préoccupations se retrouvent constamment : celle d'isoler le poison pour en déterminer la nature chimique et celle de comprendre le mode

d'action singulier du poison. Ce sont ces préoccupations qui m'ont également guidé. Je diviserai donc le présent ouvrage en trois chapitres ayant pour objets :

- 1° Une revue des faits précédemment connus;
- 2° Un compte rendu des essais d'isolement de la substance toxique;
- 3° Une étude du mode d'action de cette substance toxique.

PREMIER CHAPITRE

REVUE DES FAITS DÉJÀ ACQUIS

Lange, Henneberg, Hayduck, Baker et Hulton, et Lindet ont publié chacun de longs mémoires. Je vais les résumer le plus brièvement possible, en suivant l'ordre chronologique de leur publication. J'essayerai ensuite de les condenser tous dans une vue d'ensemble de la question.

TRAVAIL DE LANGE

Lorsqu'il eut découvert l'effet considérablement gênant de la mouture des céréales et de leurs malts sur l'activité de la levure de bière basse dans les solutions de saccharose, Lange voulut localiser le poison dans la céréale elle-même. Une bouillie faite avec plusieurs plantes entières de seigle encore vert eut une action excitante. Au contraire l'effet des grains verts, essayés à part, fut nettement défavorable. La substance toxique n'existe donc que dans le grain, mais elle y est déjà présente lorsque les grains ne sont pas encore mûrs.

Lange entreprit ensuite des essais destinés à caractériser la substance toxique au point de vue chimique. Il voulut d'abord la dissoudre, mais les extraits obtenus par macération de la mouture dans l'eau ne furent que faiblement toxiques. Les extraits préparés par épuisement de la mouture par l'éther ou par l'alcool ne révélèrent aucune toxicité et la mouture par contre gardait la sienne après l'épuisement. L'auteur pensa alors que cette substance insoluble dans l'alcool et dans l'éther, peu soluble dans l'eau, pouvait être un alcaloïde ou une protéine. Par épuisement à

l'alcool chaud en milieu acide, puis traitement de l'extrait obtenu par l'eau, l'alcool et l'éther, l'auteur essaya de retirer de la farine de seigle les alcaloïdes qu'elle pouvait contenir, mais il n'en trouva pas. Il essaya ensuite d'isoler les matières albuminoïdes d'un extrait aqueux de mouture de seigle : l'extrait filtré clair à la presse fut agité avec 3 fois son volume d'alcool; le précipité lavé à l'alcool, à l'éther puis séché dans le vide, était faiblement toxique.

Lange observait en outre que le poison du seigle est détruit par chauffage prolongé à 100° et que l'action toxique ne se manifeste pas quand on remplace dans la mesure de l'activité, la solution de saccharose à 10 % par du moût de bière.

En résumé, la substance toxique ne se présente que dans le grain. Elle est insoluble dans l'alcool et dans l'éther et semble être une matière protéique. Elle est détruite par la chaleur. Son action ne semble pas pouvoir se manifester en présence de moût de bière.

TRAVAIL DE W. HENNEBERG

Lange avait observé qu'en présence de mouture de céréales l'activité des levures basses est presque totalement annihilée.

Cette observation pouvait s'expliquer soit par une action paralysante sur la zymase, soit par la mort des cellules de levure.

Par l'examen microscopique, W. Henneberg reconnut que c'est la deuxième explication, c'est-à-dire la mort des cellules, qu'il faut adopter. Ceci lui permit de transformer le mode opératoire : au lieu d'observer l'action toxique par la mesure de l'activité, il observait directement la mort des cellules au microscope.

Il constata ainsi que les levures basses meurent très rapidement en présence de farine dans des solutions de sucre dans l'eau distillée, mais ne meurent pas en présence de farine dans l'eau distillée sans sucre. Les levures hautes de

distillerie sont beaucoup plus résistantes, mais elles peuvent devenir très sensibles à l'action de la farine lorsqu'elles ont été cultivées en série dans le laboratoire dans des moûts stérilisés. La levure basse, par contre, perd en grande partie sa sensibilité lorsqu'on la cultive sur un milieu solide de gélatine ou de gelose. En outre, la farine, incorporée dans un tel milieu, n'a aucune action nocive sur la levure qui y pousse.

Contrairement à ce qu'avait vu Lange, l'action nocive pour la levure basse persiste si l'on emploie du moût de bière à la place d'eau distillée. Elle persiste même si le moût est dilué avec de l'eau distillée. Par contre elle ne persiste pas, si la dilution du moût est faite avec de l'eau ordinaire.

L'eau ordinaire contient des sels de chaux. Ce sont ces sels qui servent de contre-poison au corps toxique de la farine. Tous les sels de chaux suppriment plus ou moins l'action nocive de la farine et de très faibles quantités suffisent, la quantité contenue dans l'eau ordinaire par exemple. W. Henneberg obtint également de bons résultats par l'addition de carbonate de potasse ou de soude et quelquefois par l'ammoniaque.

L'auteur attache une grande importance à cette neutralisation par les sels de chaux. Bien qu'Adolphe Mayer qui s'est occupé après Pasteur de la nutrition de la levure n'ait pas reconnu la nécessité absolue du calcium, diverses observations de la pratique ont montré que la chaux est un élément éminemment utile. L'auteur rappelle que Seyffert a noté les bons effets de l'addition de chaux à l'eau de brassage et que Hayduck a montré qu'en présence de sels de chaux la fermentation va notablement plus vite et la levure se dépose beaucoup mieux. L'addition de chaux produirait un abaissement de l'acidité dans la cellule. Henneberg pense que si les cellules meurent, c'est par suite de manque d'alcali. Le mécanisme qui amène la cellule de levure à la mort serait la formation excessive d'acides dans son intérieur soit au cours de la fermentation, soit dans la décomposition de la matière albuminoïde par les diastases de la

cellule. Naturellement cette explication, si elle légitime le rôle protecteur des sels de chaux, ne dit rien du fait que les levures basses sont seules sensibles, ni de celui d'après lequel c'est en présence seulement d'un sucre fermentescible que l'action nocive se manifeste.

Quoiqu'il en soit les faits nouveaux observés par Henneberg sont les suivants : l'action de la farine pour la levure basse ne se manifeste qu'en présence de sucre ; cette action est neutralisée par de faibles quantités de sels de chaux ; la levure de distillerie devient sensible à la farine quand on la cultive sur moût de bière et la levure de bière basse devient plus résistante en poussant sur un milieu solide de gélose ou de gélatine.

TRAVAIL DE F. HAYDUCK

F. Hayduck se préoccupa presque uniquement de caractériser le poison de la levure contenu dans la farine de froment. Il essaya d'abord de dissoudre le poison et quand il eut obtenu des extraits suffisamment toxiques, il s'efforça d'en séparer le poison par précipitation. Il s'occupa de la destruction du poison par le brassage et le touraillage et de l'action des sels minéraux. Afin d'expliquer la différence d'action des levures hautes et basses, il rechercha enfin des relations entre l'état physiologique de la levure et sa sensibilité à la farine de froment.

Pour observer l'action toxique, Hayduck se servit de la mesure de l'activité par la méthode Hayduck-Kusserow : 10 gr. de levure sont introduits dans un flacon de 1 litre avec 400 cc d'une solution de saccharose à 10 %. Le flacon est surmonté d'une boule contenant de l'eau dont on mesure la portion déversée par l'acide carbonique qui se dégage pendant quatre demi-heures consécutives. La farine de froment fut seule employée car elle présente sur le seigle l'avantage d'être très facile à séparer par filtration.

L'eau distillée est un mauvais dissolvant du poison. L'extrait obtenu n'a qu'une action insignifiante à côté de la farine elle-même. Toutefois, quand la macération se prolonge pendant 24 h. on observe un effet très marqué, mais cette macération ne représente plus une simple solution du poison dans l'eau, car elle s'infecte et la durée de l'expérience a permis aux diastases de la farine de jouer un rôle dans la solubilisation de la substance toxique.

L'eau distillée sucrée n'est guère un meilleur dissolvant. L'auteur étudia aussi l'effet de la glycérine, qui, on le sait, a été souvent employée comme dissolvant des diastases. La glycérine nuit, il est vrai, par elle-même à l'activité de la levure, mais on peut se servir d'une glycérine aqueuse qui ne nuira pas d'une manière assez importante pour masquer les résultats des expériences. On obtient dans ces conditions des extraits très toxiques surtout si l'extraction est prolongée et se fait à chaud. Les expériences de Lange ayant établi que le poison appartient très probablement aux matières albuminoïdes, l'auteur a été conduit à l'idée que la dissolution du poison serait facilitée par l'action des diastases protéolytiques et que c'est d'ailleurs par l'intermédiaire des diastases contenues dans la levure que le poison peut agir sur elle. L'emploi de la pepsine en milieu neutre donna en effet de bons résultats, mais la pepsine en milieu acide en donna de meilleurs encore. L'auteur eut l'idée d'essayer l'effet de l'eau acidulée par l'acide sulfurique, sans pepsine. Il obtint ainsi d'excellents résultats. L'extrait acide peut d'ailleurs être neutralisé sans inconvénient par la soude, car le sulfate de soude à faible dose n'a pas un rôle neutralisant. C'est cet extrait acide dont Hayduck se servit dans ses essais d'isolement par précipitation.

Lorsqu'on neutralise par la soude un extrait de froment fraîchement préparé, il se forme un précipité, qui est toxique. Le liquide filtré clair après la précipitation est également toxique. D'autre part, les extraits acides donnent un précipité abondant de matière albuminoïde lorsqu'on les sature par le sulfate d'ammoniaque. Ce précipité, séparé

par essorage, redissous dans l'eau et soumis à une dialyse prolongée pour éliminer le sulfate d'ammoniaque dont l'action antitoxique est très accusée, se montra très nocif pour l'activité de la levure basse. L'auteur fit mieux; il précipita par le sulfate d'ammoniaque le filtrat clair d'un extrait acide, qui avait déjà fourni un précipité toxique par neutralisation. Le second précipité, redissous et dialysé, se montra encore toxique. Il est certain, toutefois, que ces deux précipités sont au point de vue chimique des substances bien indéterminées. Aussi peut-on dire que si les essais de solubilisation ont été satisfaisants, ceux de séparation de la substance active n'ont réussi qu'en partie. Le seul résultat qu'on en peut tirer, c'est celui de renforcer l'idée de la nature protéique du poison. Hayduck précise même davantage Par analogie avec une substance toxique pour la levure, isolée par lui de la peptone de Witte par précipitation par le sulfate d'ammoniaque il nomme précipités d' « albumoses » les précipités toxiques de l'extrait de froment.

L'auteur a établi qu'en brassant du malt vert de froment et du malt pâle d'orge touraillé, le pouvoir toxique n'est pas sensiblement diminué et les moûts obtenus (moûts épais) ont encore une toxicité très grande. En les faisant bouillir, on diminue leur toxicité, mais on ne la supprime pas. L'action toxique semble liée aux drêches, car les moûts clairs, obtenus par filtration, ne sont plus toxiques et favorisent au contraire l'activité de la levure. Si le maltage et le brassage, c'est-à-dire l'action des diastases trypsiques naturelles du grain ne produisent pas la destruction, c'est que sans doute cette action ne donne jamais lieu à un dédoublement complet de la molécule des matières albuminoïdes du malt, car l'auteur a montré que la trypsine du commerce ajoutée à un extrait acide de froment neutralisé, en détruit rapidement toute la toxicité. On sait, au contraire que la pepsine dont l'hydrolyse est plus faible agit favorablement sur l'extraction du poison.

En ce qui concerne l'action neutralisante des sels, l'auteur a repris les observations de Henneberg. Il constate en

outre que les sels de baryum et de zinc agissent à faible dose et que les chlorure, sulfate, phosphate de potassium et d'ammonium agissent également, mais à des doses plus fortes. Entre ces deux extrêmes se rangent les sels de magnésium. Comment les sels exercent-ils leur rôle neutralisant? Hayduck ne pense pas que ce soit par précipitation de la matière albuminoïde, parce que plusieurs sels agissent à trop faible dose. Il est plutôt d'avis que le poison est un acide, ou un corps ayant un groupement acide, et formant des sels qui ne sont pas toxiques et qui sont peut être éliminés par précipitation. Il note, en outre, que la teneur en chaux des levures, n'a pas d'influence sur leur sensibilité.

Une bonne nutrition ne rend pas la levure de bière basse plus résistante au poison. Dans le moût et aussi en présence d'eau de levure, la farine de froment est encore toxique et sa toxicité ne disparaît que lorsqu'il y a dans la liqueur une quantité suffisante de sels de chaux. Les levures conservées pendant longtemps, ou conservées au chaud sont un peu plus sensibles au poison du froment que les levures fraîches. La culture de la levure basse dans les conditions de la fabrication de la levure à l'air, n'augmente pas sa résistance au poison du froment. La différence de sensibilité des levures de bières basses et des levures de distillerie semble être une propriété de race.

Si l'on ajoute à un certain poids de levure dans une solution de saccharose une quantité suffisante de farine, la levure meurt rapidement. Si l'on ajoute d'abord que la moitié du poids de levure, puis, après un certain temps de contact, l'autre moitié, cette nouvelle quantité de levure ne meurt pas comme la première et fermente normalement. La levure premièrement ajoutée a donc enlevé à la farine tout son poison. L'auteur émet diverses hypothèses pour expliquer ce fait : destruction du poison par la peptase de la levure, absorption de tout le poison par la levure, neutralisation du poison par le contenu des cellules mortes, mais il ne se prononce pour aucune.

En résumé, Hayduck est parvenu à solubiliser le poison par la pepsine et surtout par l'eau acidulée. Il a précipité le poison de ces extraits par neutralisation et par le sulfate d'ammoniaque. Il a établi que le pouvoir toxique subsiste dans les moûts épais, même bouillis, mais passe avec les drêches. Il a établi aussi que la bonne nutrition, la conservation au chaud ou au froid n'ont pas grande influence sur la sensibilité de la levure et enfin que la levure basse enlève toute sa toxicité à un extrait aqueux de froment et y périt.

TRAVAIL DE BAKER ET HULTON

Baker et Hulton recherchent surtout le rôle du poison en brasserie et en boulangerie. Tout d'abord ils comparent les substances, nocives pour la levure, contenues dans les céréales aux toxines végétales : ricine, abrine, crotine, qui, toxiques pour l'homme et les grands animaux, sont, elles aussi, extraites de certaines graines. Elles ne forment toutes, pour eux, qu'une seule famille de protéines toxiques.

Les macérations aqueuses de céréales non maltées, faites à froid, ne sont pas toxiques, sauf celle de froment. Des macérations préparées de même avec des céréales maltées sont toxiques, ce qui semble indiquer que pendant la germination la toxine se répand dans tout le grain. La toxicité de ces macérations diminue à mesure que progresse leur coagulation sous l'influence de la chaleur. La température à laquelle on prépare un moût de céréale maltée par infusion a plus d'influence sur la destruction de la toxine que toute ébullition ultérieure.

La toxine dans le grain résiste bien mieux à la chaleur sèche qu'à la chaleur humide. Ainsi le malt touraillé à 115° est encore toxique, tandis que le chauffage à 93° en présence d'eau diminue fortement la toxicité. Le chauffage à sec de l'orge et du froment affaiblit les toxines des céréales, mais plus dans le froment que dans l'orge. La toxine s'altère avec

le temps. Au bout de 8 ans le pouvoir germinatif des céréales a disparu, leur pouvoir diastasique subsiste et leur toxicité est notablement réduite.

En ce qui concerne la boulangerie, les auteurs ont observé que la levure de distillerie et la levure de bière font fermenter de la même manière le sucre interverti, le maltose, et les produits provenant d'une dégradation plus ou moins avancée de l'amidon.

L'activité différente que manifestent les deux levures dans un milieu provenant de céréales ou de leurs extraits est donc attribuable aux toxines et non à des différences entre les levures elle-mêmes. C'est un fait général que la mouture intégrale des céréales est moins toxique que la portion farineuse de cette mouture, car le son renferme des substances qui protègent la levure d'une manière analogue aux sels minéraux. La levure de bière était utilisée autrefois par la panification. On ne l'emploie plus aujourd'hui sans doute parce que les farines, mieux blutées, n'ont plus de son et sont par suite devenues plus toxiques. D'où vient la résistance des levures de distillerie? Baker et Hulton ont cultivé 3 fois successivement dans un moût de distillerie brassé à 55° et demeuré toxique, de la levure de bière. La levure, qui a poussé dans ces conditions, est immunisée contre le poison des céréales, comme l'est la levure de distillerie elle-même. Cette immunité semble être permanente, car la levure ainsi obtenue, après avoir été cultivée 3 fois dans du moût ordinaire de brasserie, bouillie et non toxique a conservé son caractère nouveau.

Donc, Baker et Hulton ont établi que le poison des céréales était détruit dans le moût, surtout par la température de brassage, qu'il intervenait en boulangerie pour réduire l'activité de la levure de bière et que l'immunité de la levure de distillerie semble être acquise par sélection, car cette levure est contrainte à se développer dans un moût non bouilli et toxique.

TRAVAIL DE LINDET

Lindet a constaté que les liquides provenant de la macération des pâtons sans levure, dans lesquels après stérilisation on aensemencé un certain nombre de globules et maintenu cinq à six heures à 20-25° ne diminuent pas la vitalité des globules tandis que les liquides correspondants, provenant de la macération de pâtons fermentés, l'atténuent au contraire nettement.

Le dénombrement des cellules fut fait par la méthode des plaques. Les levures employées provenaient de levains de boulangeries urbaines. Lindet attribue l'action nocive des pâtons fermentés à la toxine du froment.

RESULTATS GENERAUX

Pour plus de clarté, je vais classer les résultats acquis par les auteurs dont je viens de résumer les travaux, selon les divisions que je me propose de suivre moi-même au cours de cet exposé.

1° Recherche du produit toxique. - Voyons d'abord ce qui a été fait pour réaliser l'isolement du produit toxique et pour en déterminer la nature chimique. Il y a eu des essais pour localiser le produit toxique dans la plante entière, puis dans le grain. On s'est efforcé de l'extraire hors du grain par des solvants appropriés puis, hors de l'extrait, par précipitation. Donc trois divisions : localisation, dissolution, précipitation.

Localisation. — Lange montra que le poison n'existe que dans le grain. Il y est présent avant même que les grains soient mûrs. Baker et Hulton montrèrent que le poison se localise dans la portion farineuse du grain et que le son a plutôt un rôle protecteur.

Dissolution. — L'eau, l'alcool et l'éther furent essayés

par Lange. L'eau seule est un dissolvant, très faible d'ailleurs. Toutefois, Baker et Hulton ont montré que les macérations aqueuses des malts sont plus toxiques que celles des céréales non maltées. La glycérine serait, d'après Hayduck, un excellent dissolvant, bien que d'un emploi peu pratique. L'eau pepsinée neutre ou légèrement acide donne de très bons résultats. L'eau légèrement acide, sans pepsine en donne d'excellents également. C'est en somme, ce dernier mode de dissolution qui est le plus simple et le meilleur.

Précipitation. — En neutralisant les extraits acides fraîchement préparés, Hayduck a séparé un précipité qui, redissous, est toxique. En saturant par le sulfate d'ammoniaque le liquide clair restant après cette première précipitation, on obtient un nouveau précipité qui, redissous et dialysé, est encore toxique.

La conclusion unanime de tous les auteurs est que le poison doit-être de nature protéique. Hayduck y insiste particulièrement en se basant sur ce fait, observé par lui, que la pepsine favorise la dissolution du poison, tandis que la trypsine le détruit. La trypsine, en effet, hydrolyse complètement la molécule albuminoïde, la dégradation par la pepsine est bien plus limitée.

2° Etude de l'action du produit toxique. — Elle a consisté en un certain nombre d'observations dont plusieurs ont été vérifiées par chacun des auteurs.

Mort des cellules de levure. — La farine de froment annule presque totalement l'activité de la levure basse. Henneberg le premier constate que la cause en était la mort rapide des cellules de levure et non une paralysie de son pouvoir fermentatif, comme il était permis de le supposer.

Rôle des sucres. — Tous les auteurs ont constaté que la toxicité de la farine pour la levure ne se manifestait qu'en qu'en présence d'un sucre fermentescible. La levure meurt en présence de farine dans du moût de bière ou dans une solution de saccharose dans l'eau distillée. Avec l'eau distillée, sans sucre, elle ne meurt pas.

Rôle des sels. — Henneberg observa que les sels de chaux empêchent la farine d'être toxique pour la levure et leur effet est tel que la minime quantité de sels de chaux contenue dans l'eau ordinaire est suffisante pour assurer la neutralisation. Henneberg obtint aussi des résultats avec les carbonates de soude et de potasse et même avec l'ammoniaque. Hayduck constate l'effet neutralisant des sels de baryum, zinc, magnésium ainsi que des chlorure, sulfate, phosphate de potassium et d'ammonium. J'ai dit, en résumant leurs travaux, les idées de Henneberg et de Hayduck sur le mécanisme de la neutralisation de la toxicité par les sels.

Baker et Hulton, sans chercher à donner une explication du phénomène font un rapprochement avec certains faits connus en physiologie. D'après Maupas, Calkin et Woodworth une cellule de paramecie, se développant dans une décoction de foin, tombe en sénilité après 170 générations. On la régénère par addition de sels ou d'extrait de muscle et les cellules sont alors saines et actives après 860 générations. Moufang a observé que la levure dégénérée, traitée par l'acide phosphorique très dilué, s'améliore considérablement et que l'effet du traitement persiste au-delà de la quarantième génération. Peut-être la levure de brasserie, qui pousse toujours dans un milieu uniforme, y subit-elle un affaiblissement, mais l'action des sels la régénère.

Sensibilité de la levure. — La levure de bière basse est très sensible au poison des céréales, la levure de distillerie est résistante. En modifiant les conditions de culture on a cherché à rendre la levure basse résistante et celle de distillerie sensible. Henneberg rendit la levure basse résistante en la cultivant sur milieu solide, il rendit la levure de distillerie sensible par quelques passages sur moût de bière. Hayduck en cultivant la levure basse à l'air ne parvint pas à accroître sa résistance. Baker et Hulton en cultivant la levure basse sur milieu toxique, obtinrent une levure résistante au poison et qui ne perdait pas sa résistance en poussant à nouveau dans du moût de bière.

DEUXIEME CHAPITRE

RECHERCHE DU PRODUIT TOXIQUE

Je vais exposer à présent mes propres recherches. Mon travail a été fait dans le laboratoire des fermentations de l'Institut Pasteur, sous la direction de M. le Professeur Fernbach.

Je prie M. Fernbach de bien vouloir trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour le bienveillant accueil qu'il m'a fait dans son laboratoire et pour les conseils précieux qu'il m'a toujours donnés. Je tiens à remercier aussi M. Schœn, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, qui a bien voulu s'intéresser à mon travail et qui m'a prodigué ses encouragements.

Dans quelques cas particuliers, quand, par exemple, j'ai voulu vérifier la mort réelle des cellules, je me suis servi pour observer l'action toxique de la méthode de numération des cellules vivantes sur plaques de gélatine nutritive. Dans tous les autres cas, je me suis servi de l'activité. J'employais pour cela des flacons, qui contenaient les liquides en fermentation et qui étaient tous placés dans le même thermostat, à une température de 25-30°. Des tubes de dégagement permettaient au gaz carbonique d'être recueilli dans des éprouvettes graduées, pleines d'eau et retournées sur des cristallisoirs disposés les uns auprès des autres. Un des flacons servait toujours de témoin. Il représentait la marche normale de la fermentation et contenait : 200 cc de solution de saccharose à 10 % et 5 gr. de levure pressée (délayée au préalable dans un peu de cette solution). La contenu des autres flacons variait avec les expériences, mais il différait le moins possible de ces conditions de base, afin de rendre les résultats comparables entre eux. Le gaz car-

bonique ne commençait à être recueilli que 10 minutes après la mise des flacons dans le thermostat, afin de permettre à l'air chaud de se dégager.

Il est certain que cette façon de mesurer l'activité est très rudimentaire. On n'y tient compte ni des variations de température et de pression que subit le gaz carbonique recueilli dans les éprouvettes, ni de la solubilité de ce gaz dans l'eau, avec laquelle il a contact. La méthode est suffisante toutefois, à cause de la grande netteté des expériences: les volumes de gaz carbonique dégagé variant au moins du simple au double. Elle est suffisante aussi parce que, les flacons étant dans le même thermostat, les éprouvettes étant les unes auprès des autres, les expériences d'une même série subissent les mêmes variations physiques et sont parfaitement comparables entre elles. Plus de précision serait illusoire : deux séries d'expériences ne sauraient être comparables en effet par suite de l'emploi de la levure pressée dont l'état physiologique varie évidemment d'une fois à l'autre.

Le froment, dont je me suis servi, venait de la maison Vilmorin-Andrieux. C'était une espèce pure, dénommée « hybride des Alliés ». La farine me fut gracieusement fournie par la société des Malteries franco-belges, qui mit également à ma disposition la série de toutes les moutures et semoules, ainsi que le son et les germes, correspondant aux divers stades du traitement d'un même blé dans un grand moulin moderne.

La levure de boulangerie était la levure Springer. La levure de brasserie me fut fournie par M. Robert Schmitz, brasseur à Paris, qui m'approvisionna en levure fraîche avec une inlassable bienveillance. Je suis heureux de lui témoigner ici toute ma gratitude.

DISSOLUTION ET LOCALISATION DU POISON DANS LE GRAIN

Le grain de blé, réduit en mouture fine, est toxique pour la levure basse comme le montre le tableau suivant. On y voit l'effet de 5 gr. de mouture sur 5 gr. de levure dans 20 cc. d'une solution de saccharose à 10 %, d'après les volumes de gaz carbonique dégagés.

Après	I		II	
	Témoin	Mouture	Témoin	Mouture
1 h.	65	0	70	4
2 h.	220	0	250	10

Dans ces deux séries d'expériences l'effet toxique est très marqué. Dans l'une toutefois la levure s'est montrée plus résistante, elle était d'ailleurs un peu plus active.

J'ai voulu tout de suite vérifier les essais de dissolution faits par Hayduck, car pour localiser le poison dans le grain j'essayerai parfois de l'extraire par dissolution. Voici d'abord deux essais d'extraction avec l'eau distillée et avec une solution de saccharose à 10 %, portant chacun sur une macération de 25 gr. de mouture dans 1.000 cc de solution pendant 3 heures. Les macérations furent filtrées claires, 200cc de chaque filtrat a agi sur 5 gr. de levure.

Après	Témoin	Extrait par l'eau	Extrait par la sol. de Saccharose
1 h.	50	6	5
2 h.	225	50	20

La dissolution est donc très réelle, bien que la durée de macération soit assez faible. Il est possible que les diastases du grain aient un rôle dans cette dissolution. Le travail de Lindet, montrant que l'eau des pâtons fermentés

tuait les cellules de levure, pouvait faire craindre que les microbes étrangers infectant la macération aient un rôle, eux aussi. J'ai refait un essai de dissolution par une solution de saccharose à 10 %, mais en me servant pour l'essai comme pour le témoin, d'eau à 1 pour 1.000 de toluène. En filtrant, le toluène restait à peu près totalement sur le filtre. J'ai obtenu, avec cette macération privée de germes, les mêmes résultats que précédemment.

La dissolution par la glycérine est assez difficile à observer puisque la glycérine est nocive par elle-même. J'ai essayé toutefois avec de l'eau ou de l'eau sucrée à 1 % de glycérine. A cette faible concentration la glycérine n'est pas encore gênante pour la levure, mais ses effets sur la dissolution du poison sont déjà très marqués et l'on peut obtenir un extrait très toxique après 20 minutes seulement de macération.

L'eau acidulée par 1 pour 1.000 d'acide sulfurique concentré est, comme l'avait vu Hayduck, le meilleur des solvants. On obtient une solution limpide, qui se trouble par neutralisation et qui est aussi toxique que la mouture elle-même. Voici le tableau de deux séries d'expériences, qui ont porté sur un temps assez long et qui montrent bien le degré de toxicité des différents extraits :

Après	Témoin	Eau	SO ⁴ H ² °/°°	Témoin	Eau sucrée	Eau sucrée et Glycérine
3 h. 30	400	235	5	375	160	120

J'ai obtenu également un extrait de mouture très toxique d'une façon très différente. En délayant la mouture dans une faible quantité d'eau et en filtrant immédiatement le lait de mouture ainsi préparé, on recueille un liquide clair, qui a sur la levure des effets presque aussi grands que la mouture elle-même.

Après	Témoin	Extrait de mouture
1 h.	60	4
2 h.	210	10

Il est surprenant que le poison, peu soluble dans une grande quantité d'eau, le soit davantage dans une petite. Il doit se produire là un phénomène physique d'entraînement, comme on en a déjà observé pour l'extraction des diastases.

Localisation dans le grain.

J'ai essayé séparément l'action sur la levure basse du son et de la farine. Le son n'est pas toxique, il est même plutôt excitant. Nous verrons plus loin que c'est probablement des sels qu'il contient que provient son action excitante.

La farine, elle, est très toxique, davantage que la mouture. Ceci est logique, puisque le poison s'y trouve plus concentré et puisque les éléments excitants du son font défaut.

Voici l'analyse d'une farine de blé :

Amidon et cendres	63,64
Eau	14,54
Sucre	2,34
Graisses et gommes	7,32
Matières azotées	11,17

J'ai essayé successivement l'action sur la levure de l'amidon de froment, des graisses et des matières azotées, car ce sont dans la farine les seuls constituants susceptibles d'être le support de la toxicité. Le tableau suivant montre l'effet comparé de 3 gr. de farine et de 3 gr. d'amidon de blé, agissant dans les conditions ordinaires.

Après	Témoin	Amidon de blé	Farine de blé
1 h.	85	145	1
2 h.	310	405	2

L'amidon de blé est donc excitant pour la levure. On sait depuis longtemps que la présence de corps pulvérulents favorise considérablement la marche de la fermentation. Soßingen obtint le même effet par l'emploi de biocolloïdes et de corps fibreux, comme la tourbe, le noir de sang et le papier à filtre. Au contact de ces substances le gaz carbonique dissous dans le liquide en fermentation se dégage en bulles abondantes. C'est en abaissant la teneur en gaz carbonique et l'acidité

qu'il produit que toutes ces substances ont une influence heureuse sur la marche de la fermentation.

La farine contient des lipides. On extrait des germes de froment une huile, très soluble dans l'éther et dont les propriétés purgatives sont utilisées en médecine humaine. Il était intéressant d'essayer l'action de ces corps sur la levure. En réalité, je n'ai pas isolé les lipides eux-mêmes. Je me suis contenté d'épuiser la mouture par leurs solvants et d'essayer la mouture épuisée. Comme solvants, on s'était déjà servi de l'alcool et de l'éther, J'ai vérifié que la mouture épuisée par eux ne perdait pas sa toxicité. Je me suis servi, en outre, de l'acétone, dont voici les résultats :

Après	Témoin	Farine	Farine épuisée à l'acétone
1 h.	50	0	1
2 h.	205	1	1

L'amidon de blé, ni les matières grasses n'ont d'effet toxique. Restaient les matières azotées.

Les protéines du grain de froment. — La chimie des substances protéiques est un des chapitres les plus obscurs de la chimie en général. L'étude des sucres connaît la même obscurité jusqu'au jour où la découverte des osazones permit de les caractériser nettement. Pour les protéines il n'existe pas encore de réactif qui puisse trancher les incertitudes et éviter les confusions.

En ce qui concerne les protéines du grain de blé, on a parlé de gluten-caséine, de gluten-fibrine, de phytovitelline, de conglutine.

Quoiqu'il en soit, voici, d'après les travaux d'Osborne, qui font autorité sur ce sujet, les diverses protéines dont l'individualité chimique a pu être établie.

La gliadine se distingue de toutes les autres, parce qu'insoluble dans l'alcool absolu, elle est facilement soluble dans l'alcool neutre à 70° Gay-Lussac. Elle est un peu soluble dans l'eau pure et est soluble dans les acides et les alcalis

étendus. Elle est insoluble dans les solutions de sels neutres, même très étendues. Aussi la neutralisation des solutions acides ou alcalines la précipite immédiatement.

La *glutenine* est une protéine de composition élémentaire semblable à celle de la gliadine et fournissant comme elle en abondance de l'acide glutamique, mais elle est insoluble dans l'alcool dilué. Elle est soluble dans les acides et les alcalis étendus, mais est insoluble dans les solutions aqueuses neutres.

La *leucosine* est une protéine rappelant l'albumine, se dissolvant bien dans l'eau pure et coagulant par chauffage de ses solutions à 50-60°. L'embryon de blé contient environ 10 % de leucosine tandis que le grain entier n'en possède que 0,3 à 0,4 %. On l'extrait en épuisant la farine par l'eau et en précipitant par un volume égal de sulfate d'ammoniaque saturé. Le précipité est redissous dans l'eau et dans la solution filtrée parfaitement claire, la leucosine coagule en chauffant à 65°.

On trouve aussi dans l'embryon une *globuline* semblable par sa composition et ses propriétés à plusieurs globulines trouvées dans d'autres graines. Les globulines sont un peu solubles dans l'eau distillée. Elles sont précipitées de cette dissolution par de petites quantités de sel marin et redissoutes par des solutions plus concentrées.

Il est intéressant de noter que S. Martin, qui a décrit le premier la globuline du froment, a décrit aussi celle du jéquirity (*abrus precatorius*). De ce végétal, on extrait l'abrine, toxine agglutinante pour les globules rouges et faiblement hémolysante. S. Martin trouva des propriétés toxiques à sa globuline et l'assimila à l'abrine Osborne lui-même, étudiant les protéines de la graine de ricin, isola une globuline à laquelle il trouva les propriétés fortement agglutinantes et hémolysantes de la ricine.

Dans le grain de blé existent encore une ou plusieurs protéoses, qui ne sont présentes qu'en très petites quantités et qui sont localisées dans l'embryon. Il est probable qu'elles

sont dues à l'action des enzymes de la graine sur les autres matières protéïques.

En définitive la globuline, les protéoses et la leucosine forment toute la substance protéïque de l'embryon de blé. Pour connaître la toxicité de ces corps, il était tout indiqué d'essayer l'effet de la farine d'embryons sur la levure :

Après	Témoin	Farine d'embryons
2 h.	215	270

Cette expérience élimine en bloc la globuline, les protéoses et la leucosine. Restent seules à examiner la gliadine et la glutenine. Ce sont les protéïnes les plus abondantes. L'embryon n'en possède presque pas et l'endosperme les totalise. La teneur des farines en gliadine varie de 60 à 82% et en glutenine de 18 à 40%. De nombreux essais ont permis de noter qu'une farine de bonne valeur boulangère renfermait 25 % de glutenine pour 75% de gliadine. Ces deux protéïnes sont les éléments du gluten. On a cru autrefois que la farine de froment contenait une myosine végétale, analogue à la myosine musculaire. Cette myosine se serait transformée en gluten, comme le fait le fibrinogène en fibrine, et sous l'influence d'une ferment, mais on n'a jamais pu isoler de la farine aucune euzyne coagulante. Pour Osborne et Voorhees, le gluten est uniquement composé de gliadine et de glutenine, qui peuvent être extraites avec toutes leurs propriétés aussi bien de la farine que du gluten. En présence d'électrolytes, la gliadine se gonfle en une masse poisseuse qui confère précisément au gluten son élasticité particulière. La glutenine est le noyau solide auquel vient adhérer la gliadine. Osborne et Voorhees se sont assurés expérimentalement que l'une et l'autre sont indispensables à la formation du gluten.

Le gluten s'extrait facilement de la farine de froment. On mélange dans un mortier de la farine avec environ la moitié de son poids d'eau. Lorsque l'on a obtenu une pâte homogène, on la malaxe entre ses doigts et lorsqu'elle est de-

venue douce, s'étirant bien et n'adhérant pas aux mains, on pratique la malaxation sous le robinet d'une fontaine dont l'eau s'échappe en gouttes rapprochées. L'eau la plus convenable titre environ 20-25° hydrotimétriques. L'amidon s'élimine sous la pression des doigts. L'opération est achevée au bout de 6 à 7 minutes.

J'ai essayé sur la levure l'action du gluten, après l'avoir relavé à l'eau distillée et divisé en très petits fragments.

Après	Témoin	Gluten
1 h.	120	45
2 h.	250	70

Le gluten est donc toxique, mais moins que la mouture de froment.

Localisation dans le gluten. — Henneberg, qui avait, lui aussi, essayé l'action du gluten, ne l'avait trouvé que faiblement toxique, et encore à forte dose. Lorsque la farine agit sur la levure, la mort arrive très rapidement. Avec le gluten, au contraire, je vis la fermentation partir comme dans le témoin, puis se ralentir de plus en plus, jusqu'à s'annuler. Je me demandais alors si la fermentation, en augmentant l'acidité du milieu, n'avait pas facilité la dissolution du poison. Je voulus faire, à partir du gluten, l'essai de dissolution par l'eau acidulée qui avait réussi à Hayduck, en employant la mouture : je mis du gluten relavé à l'eau distillée, à macérer pendant trois heures dans l'eau acidulée par 1 pour 1.000 d'acide sulfurique. La macération filtrée, fut neutralisée par la soude normale. Le liquide se troublait abondamment par suite de la précipitation de la gliadine et de la glutenine, qui, comme on sait, sont solubles dans les solutions acides, mais insolubles dans les solutions salines neutres. Voici deux essais : 50 cc d'extrait neutralisé ont été ajoutés à 150 cc d'eau de façon à faire les 200 cc de solution de saccharose 10 % correspondant aux conditions ordinaires.

Après	I		II	
	Témoin	Extrait	Témoin	Extrait
1 h.	85	0	85	0
2 h.	240	0	360	0

On voit que la toxicité des extraits de gluten est considérable, égale sinon supérieure à celle de la farine. Ces extraits sont, en somme les mêmes que ceux qu'Hayduck obtenait avec la mouture, mais plus concentrés. Neutralisés, ils forment un précipité très tenu, qui passe à travers tous les filtres et ne se dépose que très lentement. Quand il est déposé, l'extrait n'est plus toxique.

Il était intéressant de savoir, si dans un extrait fraîchement neutralisé le poison existe dans le liquide ou dans les fines particules de protéine qui y demeurent en suspension. Pour réaliser la séparation j'ai employé deux procédés : la filtration sur porcelaine et la centrifugation. Ils m'ont conduit aux mêmes résultats. Sur porcelaine, il faut faire usage de bougies soigneusement lavées à l'eau acidulée par HCl, puis à l'eau distillée, afin d'éviter l'entraînement des sels de chaux. Le liquide clair qui passe tout d'abord à travers la bougie n'est pas toxique, il semble que la porcelaine ait besoin de se saturer du poison. Le liquide, qui vient ensuite, est limpide et toxique, mais si l'on veut le conserver, il se trouble au bout de quelques heures, de petits flocons blancs se déposent et la toxicité a disparu. Par centrifugation on obtient de même un liquide clair toxique, qui se trouble, dépose et perd sa toxicité avec le temps. Si l'on agite avec de l'eau le dépôt blanc de matières protéiques qui adhère au fond des tubes de la centrifugeuse, une partie du précipité revient en suspension et le liquide trouble obtenu est encore toxique.

Il semblait donc bien établi que la toxicité est liée aux protéines du gluten. Il restait à déterminer lequel des deux constituants : gliadine ou glutenine formait la substance toxique.

Gliadine et glutenine. — Il fallait isoler les deux protéines à l'état pur et essayer leur action sur la levure. On pouvait également essayer l'action des substances naturelles qui renferment soit de la gliadine, soit de la glutenine. Ces deux protéines n'existent pas, en effet, uniquement que dans le froment, ou, plus précisément, il existe ailleurs d'autres protéines qui leur semblent comparables.

La farine de seigle renferme de la gliadine et de la glutenine et l'on sait, depuis Lange, que cette farine est très toxique. La farine de fèves contient, elle aussi, de la gliadine et de la glutenine (8 de gliadine pour 92 de glutenine). Une opération devenue aujourd'hui de pratique courante en meunerie consiste même en une addition de farine de fève à la farine de blé dans le but d'augmenter sa teneur en glutenine. La farine de riz contient une gliadine, tout à fait semblable à celle du blé. J'ai essayé l'action sur la levure de la farine de fèves et de celle de riz. Non seulement ces deux farines n'eurent pas d'effet toxique, mais elles furent excitantes. Ces résultats négatifs étaient toutefois discutables, parce que le poison avait bien pu être présent, mais neutralisé par des sels. La seule solution probante était d'isoler la gliadine et la glutenine pures à partir du gluten.

Je pris 25 gr. environ de gluten relavé à l'eau distillée, essuyé avec du papier filtre et divisé en petits fragments. Je le mis dans un flacon contenant 750 cc. d'alcool à 72 %. (C'est à dessein que j'avais pris de l'alcool d'un degré légèrement supérieur au degré optimum pour la dissolution de la gliadine, car le gluten humide contient environ les 2/3 de son poids d'eau). Le flacon fut placé pendant 24 heures à l'étuve à 40° et fut agité de temps à autre. La liqueur jaune obtenue fut filtrée deux fois pour lui donner une limpidité parfaite, et le résidu de gluten fut épuisé à nouveau par 400 cc. d'alcool à 70 pendant 12 heures à l'étuve à 40°. La nouvelle portion de liqueur alcoolique, beaucoup moins colorée d'ailleurs que la précédente, fut ajoutée à cette dernière. La solution alcoolique de gliadine fut alors concentrée dans le vide à la température de 38-40° et comme la

solution en se concentrant, perdait plus d'alcool que d'eau, un peu d'alcool absolu fut ajouté à deux reprises. J'ai arrêté la concentration au moment où la solution, réduite à 250 cc. environ, commençait à se troubler et je l'ai versée en mince filet dans un grand volume d'une solution froide de NaCl à 0,1 %.

Dill et Alsberg en Amérique ont préconisé récemment l'emploi de LiCl à la place de NaCl, car ce sel s'élimine beaucoup mieux au cours de la deshydratation finale de la gliadine pure par l'alcool-éther. J'ai négligé ce perfectionnement parce que je n'ai pas été jusqu'à la deshydratation de la gliadine et parce que je savais que de petites quantités de NaCl étaient sans influence neutralisante sur la toxicité.

Après 12 heures de repos, les grumeaux de gliadine sont recueillis et lavés abondamment à l'eau distillée. Je les ai mis aussitôt à macérer dans de l'eau acidulée à 1 pour 1.000 d'acide sulfurique, comme pour obtenir un extrait toxique de gluten.

J'ai essayé sur la levure basse l'action de cet extrait ainsi que celui de la glutenine brute. Après l'épuisement par l'alcool à 70°, le résidu de gluten contenant la glutenine et peut-être encore un peu de gliadine a été lavé à l'alcool absolu, à l'éther, puis séché. C'est avec lui que j'ai fait le second extrait. Voici les résultats :

Après	Témoin	Gliadine	Glutenine brute
1 h.	125	95	0
2 h.	320	285	0

La gliadine n'est donc pas toxique, mais l'on pouvait objecter que les études antérieures avaient montré la thermolabilité du poison et que le chauffage dans le vide à 38-40° de la gliadine pouvait suffire pour détruire sa toxicité. J'ai chauffé de la même manière un extrait toxique de glutenine brute. J'ai obtenu :

Après	Témoin	Extrait
2 h.	300	0

Le chauffage dans le vide n'intervient donc pas. Seule la glutenine reste le support de la toxicité. Mais la glutenine constitue-t-elle la substance toxique elle-même? Si oui, on doit, par l'eau acidulée, obtenir des extraits toxiques jusqu'à dissolution de toute la glutenine, c'est ce qui ne se produit pas. En épuisant par l'eau acidulée le résidu de glutenine brute, la toxicité diminue vite et le quatrième extrait n'était plus toxique bien que la quantité de glutenine n'ait pas sensiblement diminuée. On pouvait penser que la glutenine se trouvait alors sous une forme trop imperméable et qu'en la rendant plus poreuse, les extraits acides deviendraient toxiques. Pour cela j'ai dissous le résidu de glutenine dans une solution de KOH à 0,2 %. Le liquide trouble obtenu a été filtré plusieurs fois et le liquide clair a été neutralisé par HCl dilué. Le précipité de glutenine, qui se produit, a été lavé à l'eau distillée et j'en ai fait un extrait acide, lequel n'était pas toxique :

Après	Témoin	Glutenine
2 h.	210	180

L'eau de précipitation de la glutenine, essayée ensuite, n'était pas toxique, non plus.

Le poison est donc une substance sans doute très active sous un très faible poids, qui accompagne la glutenine, sans être la glutenine elle-même.

Le poison est-il de nature protéïque? Hayduck en donnait pour preuve qu'il est détruit par une digestion trypsique. J'ai vérifié cette destruction en me servant d'un extrait toxique de gluten et d'une pancréatine très active. Mais rien n'est moins concluant au point de vue de la nature protéïque du poison, car si l'on peut admettre comme le fait Karl Dermby pour les toxines, que le poison est un produit de dégradation d'une protéine non toxique, selon le schéma :

Albumoses (non toxique) → Produits intermédiaires (toxique)
 Produits intermédiaires (toxique) → Produits finaux (acides-animés) (non toxique). On peut aussi admettre, comme le fait Willstater pour les enzymes, que le poison est consti-

tué par un support colloïdal et par un groupe chimique actif et que la toxicité disparaît quand est détruit l'état colloïdal du support.

ESSAIS D'ISOLEMENT PAR ADSORPTION

Hayduck avait tenté l'isolement du poison par précipitation car il croyait à une substance toxique abondante.

J'ai essayé de l'isoler par une méthode plus récente et qui a déjà donné d'excellents résultats pour la séparation des corps en faible quantité. La chimie biologique utilise beaucoup la méthode de séparation par l'adsorption, car elle a souvent affaire à des corps très actifs, dont les doses sont infinitésimales, dont la nature chimique est inconnue et dont la labilité est extrême. Pour eux, les réactifs chimiques ordinaires sont trop brutaux. L'action de l'adsorption est douce au contraire : dans un certain milieu, l'adsorbant fixe le corps à isoler et dans un autre milieu, peu différent du premier, il le libère, et cela sans transformation chimique, sans changement de température.

Qu'est-ce donc que le phénomène d'adsorption? Voici la définition qu'en donne Jacques Duclaux : « Il y a adsorption quand une substance gazeuse ou dissoute va se fixer sur une autre substance solide, liquide ou gazeuse sans qu'il y ait ni réaction chimique évidente, ni dissolution proprement dite ». Cette fixation est une action de surface, on l'observe toutes les fois qu'une substance dissoute se trouve en présence d'un solide lui offrant une très grande surface de contact. Les adsorbants usuels seront des corps poreux, présentant sous un petit volume une surface considérable. L'adsorption s'y produit toujours, mais dans des proportions très différentes suivant les cas. Il y a pour l'adsorption des règles d'affinité, très vagues d'ailleurs. C'est ainsi que le coton adsorbe le rouge Congo et n'adsorbe pas la fuchsine, tandis que la silice précipitée a les propriétés exactement inverses. Pour de nombreux savants, les signes électriques de l'adsorbant et du corps adsorbé joueraient un

rôle capital dans ces phénomènes. Jacques Duclaux n'est pas de cet avis. Il montre qu'un adsorbant plutôt acide, comme la nitrocellulose, adsorbe bien des matières colorantes basiques, mais adsorbe aussi certaines matières colorantes acides. La réaction du milieu a, en outre, une très grande influence dans un grand nombre de cas.

L'adsorption est un phénomène encore trop mystérieux pour qu'on puisse espérer en connaître les lois. Tout au plus, sait-on que l'adsorption est proportionnellement beaucoup plus grande dans les solutions diluées; qu'une fois fixé, le corps adsorbé est très difficilement enlevé par les lavages; et que la concentration dans l'adsorbant varie beaucoup moins vite que la concentration dans le liquide.

Ce sont les travaux de Willstatter qui ont mis en valeur les méthodes actuelles de purification par adsorption. Avant eux, il y avait eu déjà, sur ce sujet, des recherches isolées et des résultats, mais ils ne présentaient ni l'ampleur, ni la méthode de ceux réalisés par Willstatter. Comme adsorbants, il se servit d'alumine hydratée et de kaolin, et ses essais portèrent sur plusieurs enzymes : invertine, lipase, peroxydiastase. Les enzymes furent purifiés à un degré inconnu jusque-là : c'est ainsi que pour la peroxydiastase l'indice de purpurogalline passa de 670 à 3.100.

Les deux adsorbants n'adsorbent pas toutes les substances avec la même force : l'alumine est plus électronégative et le kaolin plus électropositif. Aussi, selon les diastases, et surtout selon le signe des impuretés, qui les accompagnent, le kaolin par exemple fixera la diastase, alors que l'alumine ne la retiendra pas.

De là, toute une méthode d'adsorption fractionnée : Willstatter et Racke préparent l'invertine à partir d'un autolysat acétonique de levure par adsorption de la diastase sur l'alumine, après adsorption préalable des substances protéiques sur kaolin.

Ces expériences ne se firent pas sans de grandes difficultés. Willstatter et Krant constatèrent que suivant le mode

de préparation du réactif adsorbant employé, on obtient des résultats très variables ainsi que suivant la température à laquelle on le prépare. D'autre part la quantité d'adsorbant a une grande importance et l'on doit veiller à ne faire intervenir celui-ci que dans des solutions convenablement diluées. L'adsorption n'est que la moitié du travail : une fois la diastase fixée sur l'adsorbant et l'adsorbant séparé du liquide par centrifugation, il faut encore libérer la diastase. C'est l'élution. On la réalise par l'emploi de certains solvants ou éluents. Jusqu'ici le choix de l'éluent est tout à fait empirique. Pour séparer l'invertine adsorbée sur de l'alumine, Willstätter emploie une solution d'ammoniaque très diluée. Pour la lipase du pancréas adsorbée sur kaolin et sur alumine, il emploie des solutions diluées de phosphates alcalins et surtout de phosphate d'ammoniaque.

Cette propriété d'adsorption qui permet d'isoler les enzymes à un degré de pureté jusqu'alors inconnu, est susceptible de généralisation. Edgard Zunz a décrit des phénomènes analogues pour les toxines, les lysines et leurs anticorps.

Le noir animal adsorbe la toxine et l'antitoxine diphtériques. L'argile, le kaolin, le talc, le kieselgur ne les adsorbent pas. Le noir animal, l'argile et le kaolin adsorbent la toxine et l'antitoxine tétaniques. Le talc adsorbe la toxine tétanique, mais pas l'antitoxine. Le kieselgur adsorbe cette antitoxine, mais pas la toxine correspondante. Le noir animal, l'argile, le kaolin et à un faible degré le talc, adsorbent les hémolysines tétaniques et du venin de cobra. Enfin aucun des produits employés n'adsorbe l'antilyisine des sérums antitétaniques et antivenimeux. Ainsi donc, la toxine diphtérique n'est adsorbée par aucun des silicates hydratés naturels et d'autre part ces produits n'agissent nullement tous de façon identique pour ce qui concerne l'adsorption de la toxine et de l'antitoxine tétaniques, des lysines tétaniques et du venin de cobra. La pureté plus ou moins grande des divers silicates influence la nature de leur charge électrique et les irrégularités de charge électrique peuvent être la cause de

l'irrégularité d'adsorption. Pour s'en rendre compte Zunz étudia l'adsorption des toxines et de leurs anticorps par divers échantillons d'acide silicique pur électronégatif et de silicate d'alumine hydraté électropositif. Les toxines paraissent d'autant mieux adsorbées que l'acide silicique est électronégatif et jusqu'à un certain point c'est le contraire qui se produit pour les antitoxines.

Récemment Karl Myrback fit une intéressante application de l'adsorption à un sujet ayant rapport à l'étude des fermentations. Otto Meyerhof a observé qu'un extrait de muscle par l'eau froide ne peut pas activer la zymase privée de son co-ferment, tandis que ce même extrait chauffé à 90° l'active très fortement. Cela ne veut pas dire que l'extrait froid n'a pas de co-zymase, mais qu'il possède une substance, destructible par la chaleur et qui gêne la fermentation. Karl Myrback se proposa d'isoler par adsorption la substance gênante de l'extrait de muscle. Il employa pour cela l'alumine et le kaolin, comme le fit Willstatter. En laissant un certain temps l'extrait de muscle en contact avec l'adsorbant, puis en filtrant, l'extrait est débarrassé de sa substance gênante. L'adsorbat ne libère rien dans l'eau pure, mais l'élution est complète avec une solution de phosphate à 3 %. Il obtint ainsi la substance gênante 10 fois plus pure que dans l'extrait de muscle. Il observa en outre que l'action gênante qui se manifeste très fortement sur la zymase de levure basse, ne se manifeste pas sur celle de levure haute. Malgré cette curieuse particularité, il est peu probable que la substance gênante de Meyerhof et Myrback ait une parenté quelconque avec le poison du froment. J'ai pu constater, en effet, que l'extrait de muscle n'a pas d'action gênante sur la fermentation de la levure basse vivante.

A l'exemple de ces auteurs, j'ai essayé de séparer par adsorption le poison du froment. Je dois dire tout de suite que si les essais d'adsorption furent très satisfaisants, ceux d'élution le furent beaucoup moins.

La substance toxique du froment se laisse facilement adsorber. Je m'en suis aperçu indirectement. Voici comment : Hayduck avait constaté que lorsque de la levure est tuée par le froment, de la levure fraîche, ajoutée ensuite, ne meurt pas et fermente normalement. La levure, qui est morte, a donc fait disparaître, en mourant, tout le poison. Et ce phénomène se constate encore, même si la quantité de froment est supérieure à celle nécessaire pour faire mourir toute la levure. Peut-être le poison s'adsorbait-il sur la levure morte? C'est ce que j'ai voulu voir, en me servant de levure tuée à la chaleur, puis lavée longuement à l'eau distillée. J'ajoutais cette levure au froment avant l'addition de levure fraîche et je constatais que la levure fraîche fermentait normalement. J'ai eu le même résultat en employant à la place de levure morte, de l'amidon cru ou du talc (lavé à l'acide chlorhydrique). Ce n'était pas à un phénomène d'excitation du genre de ceux observés par Shongen, mais bien à une adsorption que l'on avait affaire. En effet, en agitant du talc avec un extrait toxique de mouture et en filtrant, l'extrait filtré n'est pas toxique.

Après	Extrait toxique	Extrait épuisé par le talc
2 h.	65	240

L'adsorption et la levure vivante. — Si la levure morte adsorbe la substance toxique, il n'en est pas de même de la levure vivante. Ellrodt, élève de Hayduck, a montré que le contact préalable de la substance toxique avec de la levure de distillerie vivante n'empêchait pas la toxicité de se manifester ensuite vis-à-vis de la levure basse, tandis que le contact préalable avec de la levure basse faisait disparaître toute toxicité. Il s'est alors demandé si l'enlèvement de la substance toxique à un extrait de froment sucré par la levure basse, était dû à l'activité de ces cellules ou à la présence de cellules mortes. Il a fait une détermination d'activité avec de la levure basse en présence d'extrait de froment, en y ajoutant de la levure basse tuée par contact avec un extrait de

froment. La présence de cette levure tuée n'a pas eu d'influence sur la toxicité. Il en concluait que c'était la levure basse vivante qui détruisait le poison, conclusion très importante car elle suffisait à expliquer la différence de sensibilité des levures hautes et basses : la levure basse adsorbe le poison et meurt, la levure haute résiste parce qu'elle ne l'adsorbe pas. Toutefois Hayduck lui-même avait des doutes. Il est possible, disait-il, qu'en employant une quantité plus grande de levure tuée et séparée par filtration, on la verrait débarrasser le liquide de sa propriété toxique : on peut supposer que si la levure ainsi préparée a perdu sa propriété de faire disparaître le poison, c'est qu'elle a déjà abandonné au liquide dans lequel elle a péri les portions actives de son contenu, ou qu'elle a fixé en mourant une quantité telle de poison qu'elle ne peut plus en fixer davantage.

J'ai refait des essais d'adsorption avec différentes levures tuées et j'ai trouvé d'aussi bons résultats avec la levure de distillerie qu'avec celle de brasserie, ces levures étant tuées soit par l'action de la chaleur, soit par l'acétone, J'ai lavé à l'eau distillée de la levure basse tuée par la substance toxique. Elle a ensuite débarrassé un extrait toxique de sa toxicité, comme les autres levures tuées.

Il est donc probable que le résultat négatif obtenu par Ellrodt tenait à ce fait que la levure tuée qu'il employait, était déjà saturée de poison. Il est probable aussi que la levure basse vivante n'est pas plus adsorbante que la levure vivante de distillerie.

Adsorption par le kaolin, la norit. — Le poison du froment est donc très adsorbable par la levure morte, mais pour faire des essais d'élution, il était préférable de rechercher des adsorbants mieux définis. J'ai essayé d'abord le kaolin et la norit. Le kaolin est un silicate hydraté d'alumine d'une pureté relative assez considérable. Celui que j'employais avait en outre été lavé à l'acide en vue d'éliminer les traces de chaux. La norit est un noir animal spécial, fabriqué en Belgique, exempt de tous sels de calcium. 50 cc. d'un extrait neutralisé de gluten fut essayé sur de la levure

de brasserie, en même temps que 50 cc. des filtrats de cet extrait après épuisement par le kaolin et par la norit.

Après	Témoin	Extr.	Extr. épuisé par kaolin	Extr.	Extr. épuisé par norit
1 h.	45	0	—	0	50
2 h.	210	0	250	0	230

La norit et le kaolin adsorbent donc très bien la substance toxique. On voit même que les extraits épuisés par eux sont un peu excitants, peut-être à cause des traces de norit et de kaolin qui passent toujours à travers le filtre et qui peuvent être excitantes par effet Sohngen, peut-être aussi à cause des matières albuminoïdes non toxiques, qui ne sont pas adsorbées et qui sont un aliment pour la levure.

Adsorption par la silice, l'alumine et l'hydrate de fer. —

J'ai essayé encore d'autres adsorbants : la silice, l'alumine et l'hydrate de fer. La silice est préparée par précipitation du silicate de potasse par l'acide sulfurique. Le précipité gélatineux a été longuement lavé jusqu'à ce que le filtrat ne donne plus de précipité par le chlorure de baryum. Il faut en effet éliminer le plus possible le sulfate de potasse qui a un rôle neutralisant.

L'alumine fut précipitée de l'alun ammoniacal par l'ammoniaque et lavée jusqu'à ce que le filtrat ne donne plus de précipité par le réactif de Nessler, le sulfate d'ammoniaque ayant lui aussi un rôle neutralisant.

L'hydrate de fer était produit par le fer colloïdal que m'avait obligeamment fourni M. le Professeur Berdnikow et dont il se sert dans sa technique de précipitation des protides dans les bouillons peptonés.

Mes préparations de silice et d'alumine n'adsorbèrent ni l'une, ni l'autre le poison du froment. Sans doute le signe électrique intervient-il et le poison qui s'adsorbe bien sur kaolin ne saurait s'adsorber aussi bien sur l'alumine ou la silice dont le signe est opposé au sien. Il n'est pas impossible d'ailleurs que des résultats plus satisfaisants puissent être obtenus en employant d'autres échantillons d'alumine ou de silice.

Zung et Willstätter ont montré l'un et l'autre combien la qualité de l'adsorbant était variable suivant son mode de préparation. L'hydrate de fer est un médiocre adsorbant intermédiaire entre le kaolin et l'alumine :

Après	Témoin	Extrait	Extrait épuisé par l'hydrate de fer
1 h.	85	0	40
2 h.	240	0	140

Essai d'éluion sur l'adsorbat de norit. — J'ai essayé l'éluion du poison fixé sur la norit. On ne pouvait songer à employer les éluents de Willstätter : phosphates alcalins ou ammoniacale diluée, car ce sont des neutralisants de l'action toxique. L'adsorbat était lavé sur le filtre à l'eau distillée, puis mis à macérer dans de l'eau acidulée par 1 pour 1.000 d'acide sulfurique, ou dans la même eau acidulée contenant, en plus, 40 % de saccharose. L'éluion fut meilleure dans l'eau acidulée et sucrée, mais la toxicité restait faible. La majeure partie du poison n'était pas libérée.

Adsorption par la nitrocellulose. — J'ai encore fait des essais d'adsorption et d'éluion avec un autre adsorbant que Jacques Duclaux a fait connaître tout récemment et qui semble appelé à rendre les plus grands services. Il s'agit de membranes de nitrocellulose poreuse.

Les composés cellulosiques sont des adsorbants de valeur. Sans doute n'est-il pas exagéré de dire que dans la nature, où la cellulose est si abondante, ces propriétés adsorbantes jouent un rôle considérable. C'est grâce au pouvoir adsorbant très élevé de sa pulpe que le concombre est assez consistant pour être solide alors qu'il contient moins d'extrait que la bière ou le moût. Les pulpes végétales ont selon l'origine un pouvoir adsorbant très variable et comme elles adsorbent les diastases et même les microbes, on conçoit le rôle qu'elles peuvent jouer dans la digestion et dans le développement de la flore intestinale. Enfin l'industrie de la teinture est entièrement basée sur les phénomènes d'adsorption des matières colorantes par les filtres textiles.

Jean Effront qui a étudié l'adsorption des pulpes végétales, a réalisé la purification de plusieurs enzymes par adsorption sur la cellulose. Le papier à filtrer retient la ptyaline et ne la libère que dans des solutions de chlorure de sodium ou d'empois d'amidon. La pepsine en solutions convenablement diluées s'adsorbe aussi sur le papier à filtrer.

Hitchcock précéda Duclaux dans l'emploi de la nitrocellulose. Il fit des membranes de collodion et étudia leur pouvoir adsorbant sur des solutions de gélatine et d'ovalbumine.

Les membranes employées par Duclaux sont celles que fabrique la société de l'Ultra-filtre D.M.S. Elles sont constituées par une toile mince de coton enduite d'une couche de nitrocellulose de la variété de 11,5 % d'azote environ, soluble dans l'alcool-éther.

Les membranes sont poreuses, percées d'un grand nombre de canaux d'un très petit diamètre et ayant une surface totale considérable. Le liquide, qui doit subir l'adsorption passe à travers ces membranes qui sont montées sur un filtre-presse. Un avantage important est qu'avec plusieurs membranes superposées, on peut séparer plusieurs constituants d'un mélange, la première membrane fixant le constituant qui s'adsorbe le plus et ne laissant arriver aux autres membranes que les autres constituants.

Duclaux insiste sur ce fait que la nitrocellulose étant chimiquement inerte, n'abandonnant rien aux solutions acides ou alcalines peut être une matière de choix pour l'étude théorique de l'adsorption, étude qui n'a guère avancé jusqu'ici faute d'expériences dans lesquelles on sache exactement à quoi l'on a affaire. Duclaux adsorba sur ces membranes différentes matières colorantes basiques et aussi quelques colorants acides comme l'alizarine. Il se contenta des essais avec des matières colorantes, parce qu'elles rendent l'expérimentation particulièrement facile, mais il ne doutait pas que des résultats semblables puissent être obtenus avec les enzymes ou les toxines.

Je me suis servi dans mes essais d'adsorption du poison du froment des mêmes membranes D.M.S. et comme il faut obliger le liquide à passer à travers les membranes, je les fixais sur la monture d'un ultra-filtre. Cet ultra-filtre était simplement constitué par un filtre stérilisateur d'eau, vendu dans le commerce, et dont on avait enlevé la masse filtrante pour la remplacer par les membranes de nitrocellulose. Deux calottes métalliques étaient serrées l'une contre l'autre par trois écrous, formant une chambre intérieure. Cette chambre était divisée en deux compartiments, correspondant à chacune des calottes, par deux grilles métalliques. Les membranes de nitrocellulose maintenues entre les deux grilles ne pouvaient aller adhérer contre la paroi de l'une ou l'autre calotte; elle était prise entre les bords des calottes et serrée par les écrous. Elle formait ainsi une cloison entre les deux compartiments et le liquide contenu dans l'un était forcé de la traverser pour aller dans l'autre. Le liquide à filtrer arrivait par un orifice au sommet de l'une des calottes et il traversait la membrane sous l'aspiration d'une trompe en communication avec l'orifice du sommet de l'autre calotte.

J'ai voulu d'abord employer comme dans mes précédents essais, l'extrait acide de gluten, neutralisé par la soude, neutre à la phtaléine. Mais la neutralisation provoque la précipitation de la gliadine et de la glutenine en grains extrêmement fins. Ces grains forment un enduit sur la membrane de nitrocellulose, et c'est alors bien plus une filtration sur gliadine et glutenine qui se trouve réalisée, filtration très pénible et très lente d'ailleurs.

Le filtrat avait perdu sa toxicité, mais la membrane, lavée dans l'eau, abandonnait les grains, très toxiques, de gliadine et de glutenine.

Après	Témoin	Filtrat	Témoin	Eau de lavage du filtre
2 h.	440	435	350	0

J'ai essayé ensuite la filtration d'extraits légèrement acides ou alcalins et par conséquent non précipités. La filtration

est toujours lente. En milieu acide, le filtrat ne perd pas complètement sa toxicité. En milieu alcalin, le filtrat perd complètement sa toxicité. On a bien affaire, cependant, à une véritable adsorption et non à un arrêt de la substance toxique sur la surface du filtre, dans un enduit de gliadine et de glutenine. En effet l'eau de lavage du filtre n'est pas toxique :

Après	Témoin	Filtrat	Eau de lavage du filtre
2 h.	240	315	220

On voit que non seulement le filtrat n'est plus toxique mais qu'il est même excitant, probablement à cause des substances albuminoïdes non toxiques qui ont passé à travers le filtre.

Un fait curieux est qu'après filtration la réaction du filtrat soit légèrement acide à l'héliantine, bien qu'avant filtration elle soit alcaline. Le filtre a adsorbé la soude. Bien que la nitrocellulose soit une substance neutre et sans affinité, Gyemant considère qu'au point de vue de la chimie colloïdale elle se comporte comme un acide faible, et cette observation confirme ses dires.

Essai d'éluion sur l'adsorbat de nitrocellulose. — J'ai essayé d'extraire la substance toxique hors des filtres qui la retenaient par l'éluion dans l'eau légèrement acidulée ou légèrement alcalinisée. C'est l'eau légèrement alcalinisée qui m'a donné les meilleurs résultats, mais ces résultats sont faibles. Le filtre ne restitue qu'une part minime de la substance toxique adsorbée juste suffisante pour retarder le départ de la fermentation, mais non pour l'annuler. La glycérine ne donne pas de résultat.

TROISIEME CHAPITRE

ÉTUDE DE L'ACTION DU PRODUIT TOXIQUE

MORT DES CELLULES

Le produit toxique tue la levure. Henneberg l'avait déjà constaté par l'examen microscopique. J'ai refait l'expérience en dénombrant les cellules vivantes poussant dans des boîtes de Petri sur eau de touraillon gelatinée. La levure de bière était ensemencée dans une solution stérile de saccharose à 10 %, à laquelle était ajouté le filtrat stérile d'un extrait de gluten sur bougie Chamberland.

Le produit toxique filtre en effet sur porcelaine, après un certain temps durant lequel la porcelaine semble s'en saturer. Des prélèvements de 1 cm³ furent faits avec une pipette stérile au début et après 30 minutes. Ces prélèvements furent ensemencés dans des tubes d'eau de touraillon gélatinée et coulés dans des boîtes de Petri. Ils montrèrent que les levures, qui, au début, comptaient 652 cellules, par cc. avaient toute été tuées après un contact de 30 minutes avec le poison.

On trouvera plus loin des résultats semblables dans les expériences que j'ai faites sur la différence de sensibilité des levures hautes et basses. J'y ai employé le même mode opératoire, à cela près que j'ai remplacé l'extrait toxique filtré par de la farine stérilisée. Le poison se présente donc comme un antiseptique puissant vis-à-vis de la levure de bière basse. Son action est rapide, mais non pas immédiate. Je m'en suis assuré de la façon suivante : le carbonate de chaux neutralise l'action du poison. Si l'on en ajoute à un extrait de gluten en contact avec de la levure, on neutralise l'action toxique de cet extrait et tout se passe comme si l'on avait retiré le poison. Dans trois flacons j'ai ajouté

50 cc. d'extrait toxique de gluten et 5 gr. de levure de bière, puis, en même temps dans chaque flacon, une solution à 20 gr. de saccharose pour 150 cc. d'eau. On réalisait ainsi les conditions ordinaires, c'est-à-dire 200 cc. de solution de saccharose à 10 % et comme l'action toxique ne se produit qu'en présence de sucre, on faisait partir ainsi du même instant, dans les trois flacons, l'action du poison sur la levure. 1 gr. de carbonate de chaux était ajouté ensuite à des temps variables : après deux minutes dans le 1^{er} flacon, après 10 minutes dans le 2^e flacon, et après 20 minutes dans le 3^e flacon. Voici les résultats :

Après	2 minutes	10 minutes	20 minutes
2 h.	90	2	0
2 h.	380	35	0

L'action, sensible après 10 minutes, n'est complète qu'après 20 minutes, et ce n'est pas pour la levure une durée négligeable, étant donnée la rapidité de ses modifications vitales.

Influence de la réaction du milieu. — La réaction du milieu influe d'une façon certaine sur l'action des divers antiseptiques. C'est ainsi que la toxicité des alcaloïdes augmente avec l'alcalinité tandis qu'est favorisée par l'acidité l'action des corps tels que le benzoate de soude, dont la toxicité est déterminée par le radical acide.

Fernbach et Stoleru ont montré que l'action antiseptique du houblon est également influencée dans une large mesure par la réaction du milieu.

J'ai voulu voir l'influence qu'aurait la modification de la réaction du milieu sur l'action du poison du froment. Pour cela, il fallait faire des expériences où le PH reste constant. Ceci est réalisable par l'emploi de solutions tamponnées.

Dans un travail sur l'influence des phosphates sur la diastase protéolytique du malt, Fernbach et Hubert ont fait connaître l'existence des tampons. Ce sont même eux qui ont

créé cette expression de « tampon » qui a été depuis universellement adoptée. Qu'est-ce donc qu'un tampon ? Les substances amphotères sont des substances susceptibles de se dissocier pour fournir tantôt des ions H, tantôt des ions OH et même les deux genres d'ions simultanément. Leur dissociation s'effectue soit d'après la formule :



soit d'après la formule :



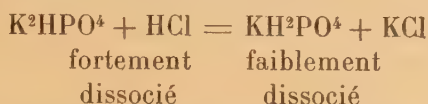
La nature de la dissociation des substances amphotères est en relation étroite avec la réaction du milieu. Si le milieu est alcalin, c'est-à-dire pauvre en ions H, la dissociation des amphotères se fera de telle sorte qu'il y ait libération d'ions H. Inversement, si le milieu est acide et par conséquent pauvre en ions OH, il y aura libération d'ions OH.

Un liquide, qui possède des substances amphotères, corrigera donc de lui-même l'excès d'ions H si on lui ajoute une solution acide et l'excès d'ions OH si on lui ajoute une solution basique. Sa réaction ne changera pas. Les substances amphotères, qui sont ainsi susceptibles de s'opposer à tout changement brusque de la réaction agissent comme des tampons, amortissant le choc entre deux wagons. Les liquides organiques sont riches en substances amphotères. Aussi un très grand nombre est-il tamponné contre les variations de la réaction du milieu. C'est le cas de l'extrait de malt, qui, ainsi que l'ont reconnu Fernbach et Hubert, possède un mélange de phosphates, jouant le rôle d'un ampholyte. C'est le cas aussi de tous les liquides de l'organisme : le sérum, la lymphe, les sucs digestifs. Dans ces liquides, les tampons ont une importance capitale, car en maintenant le PH constant, ils sont les régulateurs du jeu normal des diastases.

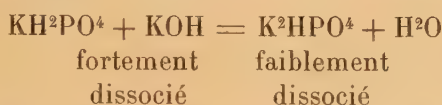
Il n'y a pas que des tampons naturels. Connaissant le mécanisme chimique du phénomène, on est arrivé à constituer des mélanges artificiels ayant les mêmes propriétés. Les tampons artificiels les plus typiques sont ceux qui sont four-

nis par des mélanges de phosphates primaires et de phosphates secondaires.

En présence d'un acide, les phosphates secondaires se transforment en phosphates primaires :



Le cas inverse se produit lorsqu'un phosphate primaire se trouve en présence d'alcali :



Un mélange de phosphates primaires et secondaires s'oppose ainsi, jusqu'à leur transformation complète à tout changement brusque de la réaction de quelque direction qu'elle vienne.

Avec deux solutions $\frac{N}{5}$ de monophosphate de soude et de diphosphate de potasse, on peut préparer toute une série de tampons dont le PH va de 8,3 en zone alcaline à 4,5 en zone acide.

J'ai fait des essais en introduisant dans les conditions ordinaires d'expérience 100 cc. de solution tamponnée. Voici 3 essais : le premier fut fait avec 30 cc. de solution de $\text{PO}^4\text{H}^2\text{Na}$ pour 70 cc. de solution de PO^4HK^2 et correspondait à $\text{PH}=7,1$. Le second fut fait avec 70 cc. de $\text{PO}^4\text{H}^2\text{Na}$ et 30 cc. de PO^4HK^2 et correspondait à $\text{PH}=6,4$. Le troisième fut fait avec 100 cc. de $\text{PO}^4\text{H}^2\text{Na}$ et correspondait à $\text{PH}=4,5$.

Après	$\text{PH} = 7,1$	$\text{PH} = 6,4$	$\text{PH} = 4,5$
3 h.	190	265	435

On voit d'abord une diminution générale de la toxicité par suite de la présence de phosphates alcalins, qui sont excitants de la fermentation et neutralisants de la toxicité (bien que beaucoup moins que les sels de chaux). Toutefois, les trois essais contiennent la même quantité de phosphates et sont

par suite comparables entre eux. On voit alors que la toxicité diminue avec l'augmentation de l'acidité du milieu.

J'ai fait une seconde expérience en me servant d'un autre tampon, celui utilisé en Amérique par H.C. Gore pour la détermination du pouvoir diastasique du malt et de l'orge. Dans la méthode de cet auteur, chaque litre de solution d'amidon à 2 % renferme 10 cc. d'acide acétique normal et 10 cc. de solution de $\text{CH}_3\text{CO}^2\text{Na}$, 3 H_2O contenant 136 grs. par litre. Ce tampon lui assure un P_H constant de 4,6. Je me suis servi de ce tampon à raison de 10 cc. d'acide acétique normal et 10 cc. de solution d'acétate de soude pour 200 cc. de liquide en expérience. Dans un autre flacon, j'ai mis 10 cc. de solution $\frac{\text{N}}{5}$ de $\text{PO}^4\text{H Na}^2$ et 90 cc. de solution $\frac{\text{N}}{5}$ de PO^4HK^2 assurant un P_H constant de 5,9. Voici les résultats :

Après	Témoin	$\text{P}_\text{H} = 5,9$	$\text{P}_\text{H} = 4,6$
1 h.	8	30	45
2 h.	50	145	225

Il n'y a donc pas de doute que l'acidité diminue la toxicité du poison de froment.

La zymase et le poison de froment. — Les expériences faites jusqu'ici ont montré que la diminution de l'activité de la levure sous l'influence de l'action toxique du froment est en rapport avec la mort des cellules. Mais ces expériences n'indiquent pas si la zymase de la levure subit en même temps un affaiblissement, où en d'autres termes, si le poison agit sur la vie de la levure ou bien est en même temps un poison de diastases. Hayduck y avait pensé. Il avait fait agir la farine de froment sur de la levure tuée au moyen de l'acétone et avait constaté que l'action de cette levure se trouve sensiblement réduite. Il convenait toutefois que l'expérience ne décidait pas si l'effet de la farine est purement mécanique ou s'il y a véritablement une destruction de la zymase.

J'ai refait l'expérience avec de la zymine et avec un extrait toxique de gluten. Avec l'extrait de gluten l'hypothèse d'un effet mécanique ne peut être envisagé. La zymine fut préparée selon la méthode d'Albert : la levure est broyée de 3 à 4 minutes dans un mortier avec de l'acétone, on agite 10 minutes, on laisse rapidement déposer, on décante l'acétone et l'on filtre sur un entonnoir Buchner. La levure essorée est agitée à nouveau pendant deux minutes dans de l'acétone, puis rapidement essorée. La masse, mise en poudre, est lavée 3 minutes à l'éther.

On filtre, on essore, on broie dans un mortier et l'on sèche dans le vide.

J'ai obtenu ainsi une zymine active. Pour le témoin j'ai employé 5 gr. de zymine dans 50 cc. d'une solution de glucose à 15 %. Pour l'autre flacon, j'ai observé les mêmes conditions mais en remplaçant l'eau distillée par un extrait de gluten. La concentration du glucose est de 15 %, car la zymine aussi bien que le suc de levure ne font fermenter que les solutions de sucre concentrées. La levure vivante, au contraire n'attaque que les solutions diluées. C'est là un phénomène encore inexpliqué.

Après	Témoin	Extrait
3 h.	15	10
6 h.	50	40

La différence est donc minime. Il ne semble pas qu'il y ait une action nocive du poison de froment sur la zymase.

ACTION DES SUCRES

La toxicité de la farine de froment pour la levure ne se manifeste qu'en présence d'un sucre fermentescible.

Elle se manifeste en présence du saccharose. Elle se manifeste aussi en présence du maltose, que contient le mout de bière. J'ai vérifié qu'elle se manifeste encore en présence

d'un sucre en C6, le glucose : 100 cc. de glucose à 10 % et 5 gr. de levure.

Après	Témoin	Extrait
1 h. 30	125	10

Le phénomène n'est pas du à la pression osmotique que crée le sucre en solution, car en remplaçant le saccharose par un sucre non fermentescible comme le lactose, il n'y a pas mort des cellules de levure, bien que la pression osmotique soit sensiblement la même qu'avec un sucre fermentescible.

Voici une expérience que j'ai faite à ce sujet : Le carbonate de chaux est neutralisant et dès qu'on en ajoute l'action du produit toxique est suspendue. Dans un flacon A, qui servira de témoin j'ai mis en plus des constituants ordinaires, 50 cc. d'extrait de gluten, 5 % de lactose et 1 gr. de carbonate de chaux. Dans un flacon B, j'ai mis d'abord l'extrait de gluten, la levure et le saccharose, puis 30 minutes après, j'ai ajouté le lactose et le carbonate. De cette façon l'extrait de gluten a été en contact avec la levure, en présence de saccharose pendant une demi-heure et a pu agir sur elle.

Dans un troisième flacon C, j'ai mis d'abord l'extrait de gluten, la levure et le lactose ; puis, 30 minutes après, j'ai ajouté le saccharose et le carbonate. De cette façon l'extrait de gluten a été en contact avec la levure, en présence de lactose, pendant une demi-heure.

Nous avons donc :

- A. — Gluten + levure + sacch. + lactose + carbonate.
 B. — [Gluten + levure + sacch.] + après 30' lactose + carbonate
 C. — [Gluten + levure + lactose] + après 30' sacch. + carbonate

Après	A	B	C
1 h.	15	0	15
2 h.	165	0	155

Non seulement l'extrait de froment n'est toxique qu'en présence d'un sucre fermentescible, mais sa toxicité est fonc-

tion de la concentration du sucre. Plus la solution de sucre est concentrée, plus l'extrait est toxique. Voici une expérience, qui montre l'influence de la variation de la concentration du saccharose :

Après	2% de sucre		5% de sucre		10% de sucre	
	Témoin	Extrait	Témoin	Extrait	Témoin	Extrait
1 h. 30	70	15	130	25	140	0

De ce tableau, on peut déduire :

	2% de sucre	5% de sucre	10% de sucre
% de cellules mortes	78	80	100

La teneur moyenne en sucre des farines de froment est de 2 %. On peut voir par là le rôle nocif très réel que le poison aura sur la fermentation panaiïre faite avec une levure de brasserie. Bien que la chaux contenue dans l'eau ne manque pas d'avoir un rôle neutralisant, sa quantité, qui est insuffisante dans celles de la fermentation panaiïre, où la proportion de farine est considérablement augmentée.

Voici d'ailleurs une expérience que j'emprunte au travail de MM. Baker et Hulton et qui ne laisse pas de doute à ce sujet : 1 gr. de levure fermente dans 20 gr. de farine et 50 cc. d'eau, sans addition de saccharose.

	Eau distillée	Eau du robinet	Eau de robinet + SO^4K^2 à 0,6 %
Levure de brass.	10	34	181
Levure de distil.	340	343	343

Nous allons voir que si l'action toxique se manifeste toujours, à n'importe quelle température, en présence du sucre, elle peut se manifester sans sucre à la condition d'être observée à une température suffisante.

Dans les expériences qui vont suivre, je me suis servi de farine et non d'extrait de gluten. Avec le temps, les fines particules protéïques de l'extrait de gluten s'agglutinent et précipitent ; l'extrait perd sa toxicité. Or, j'avais à réaliser

de longs contacts entre la levure et la substance toxique. C'est pourquoi je me suis servi de farine, qui n'a pas l'inconvénient de l'extrait de gluten.

Nous savons qu'en présence du sucre, la levure est tuée rapidement par la farine de froment à la température ordinaire. A 2° elle est tuée également. En effet, dans un flacon A, servant de témoin, j'ai mis 5 gr. de farine et 1 gr. de carbonate de chaux et les constituants ordinaires. Dans un autre B, je n'ai pas mis le carbonate. J'ai laissé une heure les deux flacons dans une glacière à 2°. J'ai ajouté ensuite le carbonate, en B, où il faisait défaut, et j'ai mesuré l'activité dans les deux flacons.

Dans A, la farine a son effet neutralisé par le carbonate.

Dans B, la farine agit une heure sur la levure en présence de sucre et à 2°.

Après	A	B
2 h.	285	0

La faible température n'empêche donc pas le poison d'agir.

Que se passe-t-il quand la levure est en contact avec la farine sans sucre ? Si le contact est court, il ne se passe rien d'appréciable, la levure reste vivante. Si le contact est plus prolongé, pendant 15 heures par exemple, le poison agira ou n'agira pas selon la température.

Dans un flacon témoin, j'introduisais 5 gr. de levure, 5 gr. de farine et 1 gr. de carbonate de chaux, puis après 15 heures j'ajoutais le saccharose de façon à faire une solution à 10 %. Dans l'autre flacon, j'introduisais la levure et la farine sans carbonate et la levure restait ainsi au contact de la farine pendant 15 heures, puis j'ajoutais le carbonate et le saccharose. On avait donc :

1° — [Farine + levure + carbonate] + sucre

2° — [Farine + levure] + carbonate + sucre

J'ai fait une fois l'expérience à 2°. Une autre à 27°.

Après	à 27°		à 2°	
	Témoin	Levure et Farine	Témoin	Levure et Farine
1 h.	165	15	60	75
1 h. 30	305	30	195	170

On voit donc que la farine sans sucre à un effet très marqué à 27°, tandis qu'elle n'en a pas à 2°.

Sur la levure de boulangerie, la farine en présence de sucre a un effet excitant. Mais si la farine sans sucre est laissée longuement en contact avec cette levure et si la température est suffisamment élevée, on observe la mort de la majeure partie des cellules. Le phénomène est exactement le même que celui qui se produit avec la levure de bière basse sans sucre. Voici une expérience faite avec de la levure de boulangerie, à 27° et dans les mêmes conditions que dans l'expérience précédente :

Après	Témoin	Levure et Farine
1 h.	50	30
2 h.	380	70

Ainsi, en présence de sucre et de farine, les deux levures se comportent d'une façon entièrement différente : la levure de bière meurt rapidement, celle de boulangerie résiste.

Au contraire, en l'absence de sucre, les deux levures se comportent pareillement.

Cette constatation n'est pas sans importance, elle permet, me semble-t-il, de conclure à la non-spécificité du poison pour la levure de bière basse. Le poison agit lentement sur toutes les levures et s'il semble agir sur la levure basse avec une activité spéciale, c'est que la levure basse, en commençant à fermenter, se trouve dans un état physiologique particulier qui la rend très fragile.

ACTION DES SELS

Henneberg observa, le premier, l'action neutralisante des sels de chaux, qui à des doses très faibles empêchent la farine d'être toxique. Il reconnut aussi l'action neutralisante, mais à doses plus fortes, des carbonates de soude et de potasse, ainsi que l'ammoniaque. Hayduck étudia celle des sels de baryum, zinc, magnésium ainsi que des chlorures, sulfates, phosphates de potassium et d'ammonium. Baker et Hulton ne se servirent comme agent neutralisant que du sulfate de potassium. J'ai vérifié l'action de ces divers sels et je me suis rendu compte qu'à une concentration suffisante tous les sels que j'essayais, devenaient neutralisants. C'est ce qui arrivait notamment pour le chlorure de sodium. Une solution de NaCl à 1 % a en effet le même pouvoir neutralisant qu'une solution de CaCl_2 à 0,02 %. Voici l'effet de ces deux solutions sur 5 gr. de farine en contact avec 5 gr. de levure :

Après	NaCl 1°/o	CaCl_2 0,02 %
2 h.	135	140

Baker et Hulton ont remarqué que la mouture intégrale est moins toxique que la farine, car le son renferme des substances que protègent la levure d'une manière analogue aux sels minéraux. Ils se sont demandé si cet effet protecteur ne dépendait pas d'une antitoxine définie. Ceci est peu probable, car l'extrait aqueux de son est, en effet, protecteur, mais le même extrait bouilli l'est davantage.

Quel est le mode d'action des sels? Nous avons vu qu'Henneberg pensait à une neutralisation d'acides produits en grand excès à l'intérieur de la cellule, sous l'influence du produit toxique, qu'Hayduck écartait l'idée de la précipitation des matières protéiques par les sels, car les sels de chaux agissent à des doses très faibles. Il se ralliait plutôt à l'hypothèse d'une neutralisation chimique : le produit toxique serait un corps à fonction acide et formerait des sels non toxiques; la neutralisation s'opérerait à l'exté-

rieur de la cellule. Baker et Hulton, sans vouloir se prononcer rapprochaient le phénomène de celui observé par les physiologistes, d'après lesquels la vitalité de certains animaux inférieurs est renouvelée par l'addition de sels, ils pensaient que la levure de bière, poussant toujours dans le même milieu, s'y affaiblissait, mais que l'apport de sels la stimulait et lui donnait la résistance nécessaire pour résister au poison.

Il ne me semble pas que l'action des sels puisse porter sur la levure. La levure, conservée dans de l'eau riche en calcium, ne devient pas pour cela, plus résistante au poison du froment. En outre, si l'on fait, d'une part, un extrait de gluten avec une eau contenant une certaine quantité de sels de chaux, et si, d'autre part, à un autre extrait, fait dans les mêmes conditions, mais avec de l'eau distillée, on ajoute la même quantité de sels de chaux, on a, de part et d'autre, la même proportion de poison et de sels de chaux, et, cependant la neutralisation n'est pas aussi accusée dans l'un et l'autre cas. C'est l'extrait où le poison séjourne depuis le plus de temps au contact des sels de chaux, qui est le plus neutralisé.

Ainsi, un extrait a été fait avec 5 gr. de gluten dans de l'eau à 0,02 % de chlorure de calcium. Un autre a été fait avec 5 gr. de gluten dans de l'eau distillée et la quantité convenable de CaCl_2 a été ajoutée ensuite pour faire une solution à 0,02 %. Les résultats sont les suivants :

Après	Ca Cl^2 avant	Ca Cl^2 après
2 h.	120	30

La neutralisation doit donc se faire par action directe du sel sur le poison, soit par réaction chimique comme le pensait Hayduck, soit par précipitation. La précipitation n'est pas inadmissible, car d'une part la substance toxique est peu abondante, et d'autre part tous les sels à concentration convenable neutralisent son action.

SENSIBILITE DE LA LEVURE

En présence de sucre, la levure de bière basse est très sensible au poison du froment, la levure de boulangerie et de distillerie est résistante. En modifiant les conditions de culture, on a cherché à rendre le levure basse résistante et celle de distillerie sensible.

Henneberg rendit la levure basse résistante en la cultivant sur milieu solide, il rendit la levure de distillerie sensible par quelques passages sur moût de bière. Hayduck en cultivant la levure basse à l'air ne parvint pas à accroître sa résistance. Baker et Hulton en cultivant la levure basse dans un moût toxique obtinrent une levure résistante au poison et qui ne perdait pas sa résistance en poussant à nouveau dans du moût de bière.

Il y avait contradiction entre les résultats d'Henneberg et ceux de Baker et Hulton. Pour Henneberg la levure était résistante ou sensible selon le milieu où elle poussait. Pour Baker et Hulton, la résistance au poison était une propriété de race. J'ai cherché à savoir qui avait raison.

Voyons d'abord ce que l'on sait sur les différences existant entre la levure basse et la levure haute de boulangerie.

La levure basse a un pouvoir respiratoire relativement faible : sur 100 molécules de sucre qui disparaissent dans une fermentation à l'abri de l'air, 1 ou 2 molécules seulement sont brûlées, tandis que 99 sont fermentées. La levure pressée de boulangerie, dans les mêmes conditions a une respiration 6 à 8 fois plus intense que celle de la levure basse.

On s'accorde, d'autre part, à admettre que les levures de fermentation haute sont incapables de provoquer la synthèse de l'hexose phosphate d'Harden et Young, pas plus d'ailleurs que les préparations zymasiques qui en proviennent. On admet aussi que si le pouvoir synthétisant des levures basses est également nul tant que ces organismes agissent à l'état vivant, la synthèse de l'hexoséosphosphate peut avoir lieu dans de certaines limites en présence d'un poison

protoplasmique tel que le toluène, en concentration appropriée.

Je me suis demandé s'il n'y avait pas une relation entre la sensibilité de la levure au poison du froment et son pouvoir respiratoire. Otto Meyerhof a indiqué que la présence de bleu de méthylène intensifié d'une façon remarquable, l'adsorption de l'oxygène par les cellules basses et que la présence d'acide cyanhydrique à la concentration $\frac{M}{1000}$ influe peu sur l'acte fermentatif de la levure pressée, mais empêche presque complètement la respiration.

J'ai essayé avec des solutions de 0,002 à 0,02 % de bleu de méthylène à accroître le pouvoir respiratoire de la levure basse, mais cela n'a pas eu d'influence sur sa sensibilité au poison du froment. De même, je n'ai pas constaté un accroissement de la sensibilité de la levure de boulangerie avec des solutions $\frac{M}{1000}$ de KCN. Il n'y avait donc pas lieu de poursuivre dans cette voie.

J'ai cherché alors quels résultats je pourrais obtenir en modifiant les conditions de culture. A partir de la levure de brasserie Schmitz et de la levure de boulangerie Springer j'ai fait des cultures pures dans différents milieux.

Vu les faibles récoltes de levure que j'obtenais, je ne pouvais songer à mesurer l'action de la substance toxique par l'activité. J'ai compté les cellules survivantes, non au microscope, mais par ensemencement sur boîtes Petri. Je me servais pour cela de deux flacons stérilisés, contenant chacun 50 cc. de solution de saccharose à 10 % et j'y ensemencerais avec la même pipette Pasteur, un nombre égal de gouttes de la culture sur laquelle je voulais connaître l'action du froment. L'un des flacons servait de témoin et à l'autre étaient ajoutés 2 gr. de farine stérilisée. Après un séjour de 2 heures dans l'étuve à 25° je prélevais stérilement 1 cc. du liquide de chaque flacon et je l'ensemencerais dans un tube d'eau de touraillon gélatinée que je coulais dans une boîte de Pétri.

La farine a été substituée à l'extrait filtré de gluten, parce que la filtration de ce dernier était longue, et la toxicité du

filtrat très variable. Cette substitution n'avait pas d'inconvénient. Henneberg a reconnu, en effet, que la farine incorporée dans un milieu nutritif solide, n'a pas d'effet toxique pour la levure qui y pousse et d'autre part je m'étais assuré que l'aspect des colonies suffisamment poussées ne saurait être confondu avec celui des grains de farine, qui ne gênent pas, par suite, le dénombrement.

Pour stériliser la farine, je la lavais d'abord à l'acétone. Ce lavage, qui n'altère pas, on le sait, la toxicité, dessèche la farine, tout en assurant une première stérilisation. Une fois la farine sèche, elle est mise par portions de 2 gr. dans des tubes stérilisés et portée quelques instants à la température de 110° en chaleur sèche. Dans ces conditions, la farine conserve très bien sa toxicité, dont le grand ennemi est la chaleur humide : un pâton de farine séché même à la température ordinaire perd en séchant toute toxicité ; la mie de pain n'est pas toxique. Les diastases et les toxines adhérentes aux précipités desséchés dans le vide sont, de même, bien plus résistantes qu'en milieu humide : ainsi la toxine tétanique sèche est encore faiblement active après un chauffage de 15 minutes à 120°.

Influence du milieu de culture. — Avec cette méthode, j'ai d'abord voulu vérifier si la levure de boulangerie pouvait devenir sensible quand on la cultive sur moût de bière. Voici les résultats obtenus avec de la levure de boulangerie repiquée deux fois, d'un part sur moût de bière, et d'autre part sur eau de levure. Cette eau de levure était préparée selon la méthode ordinaire du laboratoire, c'est-à-dire en faisant bouillir 50 gr. de levure pressée dans 1 litre d'eau, en filtrant et en ajoutant 4 % de glucose. Les cellules mises au contact de la farine venaient de cultures de 24 heures.

	Moût de bière	Eau de levure
Témoin	1025	1616
Farine	12	94
Cellules mortes	99 %	94 %

On voit que la levure de boulangerie perd sa résistance non seulement dans le moût de bière, comme on le savait déjà, mais aussi dans l'eau de levure, milieu riche en peptone et stérilisé par chauffage, comme le moût de bière.

La sensibilité ne dépend-elle pas de la nature de l'aliment azoté offert à la levure? J'ai cultivé de la levure de bière basse dans un milieu artificiel, très différent du moût de bière:

Acide tartrique . . . 2 gr.	Phosph. d'ammonium 5 gr.
Phosph. de potassium 1 gr.	Peptone 0 gr. 1
Sulfate de magnésium 0 gr. 1	Asparagine 0 gr. 1

Pour 1 litre d'eau distillée et 100 gr. de saccharose.

Sur ce milieu la levure de bière gardait sa sensibilité, ainsi que le montre le tableau suivant :

	1 ^{re} culture	2 ^e culture
Témoin	640	1020
Farine.	16	2
Cellules mortes	97,5 %	99,9 %

Influence des conditions de culture. — Puisqu'en changeant de milieu, la levure de bière n'en devient pas plus résistante, peut-être obtiendra-t-on de meilleurs résultats en changeant les conditions de culture.

Je l'ai cultivée sur milieu solide, sur moût de bière gélosé, et conformément aux indications des travaux précédents, ce traitement a accru sa résistance :

	Moût de bière gélosé
Témoin	242
Farine	102
Cellules mortes	57 %

Soit, par une seule culture, une diminution de 40 % du nombre des cellules mortes. Cet accroissement de résistance tient-il au fait que la levure se développe ici d'une façon purement végétative, sans exercer son pouvoir ferment? S'il

en est véritablement ainsi, l'accroissement de résistance se produira également en milieu liquide en aérant la levure suffisamment. Hayduck y avait pensé, il avait cultivé de la levure basse avec aération, dans les conditions de la fabrication de la levure pressée. L'expérience fut négative. Toutefois Hayduck n'avait fait qu'une seule culture. J'ai recommencé l'expérience en cultivant la levure sur moût de bière, au large contact de l'air dans des flacons Fernbach, et j'ai fait une série de cultures successives dont voici les résultats :

	1 ^{re} cult.	2 ^e cult.	3 ^e cult.	4 ^e cult.
Témoin	30	272	1324	802
Farine	4	7	482	511
Cellules mortes	96 %	97 %	63 %	36 %

La résistance croît lentement, mais cependant d'une façon très appréciable, puisque de la 1^{re} à la 4^e culture la mortalité a baissé de 60 %. La culture à l'air est-elle la cause de la résistance de la levure de boulangerie? Si oui, l'expérience réciproque doit-être possible, c'est-à-dire que cette levure, qui, nous l'avons vu, perd si vite sa résistance quand on la cultive dans du moût de bière, demeurera résistante en la cultivant dans le même milieu, mais au contact de l'air, en flacon Fernbach :

	Culture ordinaire	Culture aérée
Témoin	152	212
Farine	6	98
Cellules mortes	96 %	53 %

A l'air et sur moût de bière, la levure de boulangerie perd sa résistance, mais elle la perd moins vite qu'à l'abri de l'air. On peut donc conclure que la vie à l'air est un des facteurs de la résistance de la levure au poison du froment, mais que l'aération est insuffisante, à elle seule, pour assurer cette résistance.

Résistance passagère et résistance de race. — Baker et Hulton considéraient la résistance de la levure de boulangerie comme une propriété de race.

Les levures, poussant dans des moûts toxiques, s'y sélectionnaient et les races survivantes ne perdaient plus leur résistance acquise par sélection. Cette conception est en contradiction avec les résultats exposés plus haut d'après lesquels la levure de boulangerie perd rapidement sa résistance en poussant dans le moût ou dans l'eau de levure. Elle est incompatible également avec le fait que les levures actuelles de boulangerie sont cultivées non sur des moûts de céréales, mais sur des mélasses de sucrerie.

Il serait inexact toutefois de nier l'existence de races de levure possédant une résistance durable, quelque soit le milieu où on les cultive.

J'en ai isolé une de ce genre, de la levure de la brasserie Schmitz et c'est vraisemblablement avec une race analogue que durent opérer Baker et Hulton.

A part les levures de la race spéciale que j'ai isolées, toutes les autres dégénèrent rapidement et redeviennent sensibles par culture sur moût de bière. Je l'ai vérifié pour les levures devenues résistantes par culture sur moût gelosé et sur moût liquide en flacon Fernbach. Voici les résultats que fournit la levure cultivée en flacon Fernbach puis repiquée trois fois en tubes de moût de bière :

	2 ^e culture	3 ^e culture
Témoin	454	1692
Farine	252	218
Cellules mortes	44 %	87 %

On était parti d'une levure, dont le nombre de cellules mortes dans les conditions des expériences était de 36 %. Après 3 cultures sur tubes de moût de bière, ce nombre est de 87 %. La résistance de cette levure a donc diminué de 51 %.

Mêmes résultats pour la levure sur moût gelosé. Cette levure fut repiquée 5 fois sur tubes de moût de bière :

	2 ^{me} culture	5 ^{me} culture
Témoin	62	680
Farine	8	32
Cellules mortes	87 %	95 %

Le nombre de cellules mortes de cette levure a donc passé de 57 % à 95 %.

La levure, résistante par race au poison du froment, provenait d'une colonie ayant poussée dans une boîte de Pétri, après avoir résisté à l'action de la farine, au cours d'une expérience. Cela ne veut pas dire que toutes les colonies, ayant poussées dans ces conditions, peuvent fournir des races résistantes. Voici, en effet, le résultat du contact de la farine avec les cellules d'une culture provenant d'une colonie poussée dans la même boîte Pétri que plus haut, et après un seul passage sur moût de bière.

Témoin	272
Farine	23
Cellules mortes	91 %

Au contraire, cinq passages successifs sur moût de bière n'ont pas altéré la résistance de la race spéciale.

	3 ^{me} culture	5 ^{me} culture
Témoin	561	654
Farine	544	682
Cellules mortes	3 %	0 %

Les levures pressées, que l'on emploie actuellement en boulangerie n'ont vis-à-vis du poison de froment qu'une

résistance passagère, qui doit leur venir des conditions de culture et du milieu.

Sans doute serait-il plus avantageux de n'employer pour cet usage que des levures de race résistante, dont nous connaissons à présent l'existence.

CONCLUSIONS

En dehors de la vérification de plusieurs observations importantes, que les travaux antérieurs avaient déjà fait connaître, ce travail présente un certain nombre de résultats nouveaux, que je vais rappeler brièvement.

I. — L'étude de la nature du produit toxique a établi les faits suivants :

1° En délayant la farine dans une faible quantité d'eau et en filtrant immédiatement, on obtient un liquide clair, qui est aussi toxique et plus rapidement préparé que les meilleurs extraits réalisés par Hayduck;

2° De tous les constituants de la farine, seul le gluten est toxique;

3° Les extraits de gluten par l'eau acidulée à 1 pour 1.000, sont extrêmement toxiques;

4° En dernier ressort, c'est sur la glutenine que se fixe le poison, mais par épuisement par l'eau acidulée on peut débarrasser du poison la glutenine, qui, par elle-même, n'est pas toxique;

5° Le poison s'adsorbe sur les levures mortes, l'amidon cru, le talc, le kaolin, la norit en milieu neutre. Il s'adsorbe

aussi en milieu légèrement alcalin sur la nitrocellulose. Il ne s'adsorbe pas sur la silice et l'alumine.

D'après ces résultats, le poison du froment apparaît comme un corps agissant à doses très faibles, et comparable dans une certaine mesure aux toxines et aux diastases.

II. — L'étude de l'action du produit toxique a fourni d'autres résultats :

1° Le poison n'a pas d'action sur la zymase. En présence de sucre, il tue la levure basse assez rapidement, mais sa toxicité diminue quand augmente l'acidité du milieu.

2° L'action rapide du poison ne se manifeste qu'en présence d'un sucre fermentescible et elle est fonction de la concentration de ce sucre;

3° En présence de sucre, le poison agit rapidement sur la levure basse quelque soit la température. Sans sucre, le poison est sans action à la température de 2°, mais à 27° il est capable d'agir lentement aussi bien sur la levure basse que sur la levure haute de boulangerie;

4° Tous les sels semblent pouvoir neutraliser l'action du poison si on les emploie à une concentration suffisante. On ne neutralise pas pareillement un extrait de gluten en lui ajoutant une même quantité de sels de chaux pendant ou après sa préparation;

5° La levure basse, cultivée dans d'autres milieux stériles que le moût de bière, n'y perd pas sa sensibilité, tandis que la levure de boulangerie, cultivée sur moût ou sur eau de levure, perd sa résistance;

6° La culture sur moût, au large contact de l'air, retarde la perte de la résistance de la levure de boulangerie, et accroît lentement la résistance de la levure basse. Cultivée à nouveau sur moût, dans les conditions ordinaires, la levure basse recouvre lentement son ancienne sensibilité;

7° Il existe des races de levures, qui, bien que cultivées sur moût, restent insensibles à l'action du poison du froment.

BIBLIOGRAPHIE

- B. d'Arbouet. — *Rev. gén. des colloïdes*, avril 1926, N° 30, p. 97.
- J.-L. Baker et H.-F. Hulton. — *Journ. of the Institute of Brewing*, 1910, p. 395 et 431 et *Ann. de Brasserie*, 1911, t. XIV, p. 241 et 274.
- K. Dernby. — *Journ. gén. Physiol.*, 1925, t. VIII, p. 311.
- D.-B. Dill et C.-L. Alsberg. — *Journ. of biol. chem.*, 1925, t. LXV, p. 279.
- J. Duclaux. — *Rev. gén. des colloïdes*, mai 1926, N° 31, p. 137.
- J. Duclaux. — *Les Colloïdes* (Gauthier-Villars), 1924, 3^e éd.
- J. Effront. — *C.-R. Soc. Biol.*, t. LXXXVI, p. 271 et t. LXXXVII, p. 128.
- J. Effront. — *Moniteur Quesneville*, 1926, t. XVI, p. 29.
- A. Fernbach et L. Hubert. — *C.-R. Ac. des Sc.*, 1900, t. CXXXI, p. 293.
- A. Fernbach et Stoleru. — *C.-R. Ac. des Sc.*, 1924 t. CLXXIX, p. 293.
- H.-C. Gores. — *Ann. de Brasserie*, 1924-25, t. XXIII, p. 297.
et *J. Am. Chem. Soc.*, 1925, t. XXXXVII, p. 281.
- Gyemant. — *Koll. Zeit.*, 1921, t. XXVIII, p. 103.
- F. Hayduck. — *Woch. f. Brauerei*, 1907, N° 49 et suivants et *Ann. de Brasserie*, 1908, t. XI, p. 142 et 150.
- F. Hayduck. — *Woch. f. Brauerei*, 1909, N° 14 et suivants et *Ann. de Brasserie*, 1909, t. XII, p. 265.
- F. Hayduck. — *Woch. f. Brauerei*, 1910, N° 13 et *Ann. de Brasserie*, 1910, t. XIII, p. 179.
- F. Hayduck. — Conférence faite le 15 octobre 1908 à l'Ecole de Brasserie de Berlin et *Ann. de Brasserie*, 1909, t. XII, p. 82.
- W. Henneberg. — *Jahrb. d. Vers. u. Lehraust. f. Brauerei in Berlin*, 1907, p. 628, et *Ann. de Brasserie*, 1908, t. XI, p. 112.
- W. Henneberg. — *Woch. f. Brauerei*, 1908, N° 6 et suivants, et *Ann. de Brasserie*, 1908, t. XI, p. 261 et 267.

- D.-I. Hitchcock. — *Journ. gén. Physiol.*, 1925, t. VIII, p. 61.
- H. Lange. — *Woch. f. Brauerei*, 1907, N° 32 et suivants, et *Ann. de Brasserie*, 1908, t. XI, p. 100.
- Lindet. — *Ann. de Brasserie*, 1910, t. XIII, p. 156.
- O. Meyerhof. — *Pfügers Arch.*, 1917, t. CLXIX, p. 87.
- O. Meyerhof. — *Biochem. Zeitschr.*, 1925, t. CLXII, p. 43.
- K. Myrback. — *Zeits. f. physiol. chem.*, 1925, t. CXXXXIX, p. 52.
- Osborne et Harris. — *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1903, t. XXV, p. 842.
- Osborne, Mendel et Harris. — *Am. Journ. of Physiol.*, 1905, N° 14.
- Osborne et Voorhees. — *Am. Chem. Journ.*, 1893, t. XV, p. 392.
- M. Schœn. — *Le problème des fermentations*. (Masson), 1926.
- N.-L. Sohngen. — *Folio microbiologica*, 1913, t. II., p. 94 et *Ann. de Brasserie*, 1914-19, t. XVII, p. 252.
- Willstatter et Krant. — *Ber. d. deutsch. chem. ges.*, t. LVI, p. 3601.
- Willstatter et Racke. — *Ann.*, t. CCCCXXV, p. 1.
- E. Zunz. — *Zeit. f. Immunitätsforschung*, 1913, t. XIX, p. 326.



DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

Rayons X et structure cristalline

Vu et approuvé :

Paris, le 2 Mai 1927.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

G. MAURAIN.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY.

